

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Sara Isabel dos Santos Quintela
10090413

**Qualidade da água para consumo
humano: riscos associados à presença de
biofilmes em torneiras de espaços
escolares**

Mestrado em Higiene e Segurança nas Organizações

Setembro de 2016

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA
SAÚDE DO PORTO
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Sara Isabel dos Santos Quintela

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO
HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA
DE BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS
ESCOLARES.

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Higiene e Segurança nas Organizações, realizada sob a orientação científica de Marisa Alexandra Marques de Freitas, Prof. Adjunto Convidado da área científica de Saúde Ambiental e coorientação de Maria Manuela Ramos Vieira da Silva, Prof. Adjunto da área científica de Saúde Ambiental.

S e t e m b r o , 2 0 1 6

Agradecimentos

No final desta etapa tão enriquecedora, dirijo as minhas próximas palavras de agradecimento a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

À Professora Marisa Alexandra Freitas, gostaria de agradecer profundamente por todo o apoio demonstrado a vários níveis: pela disponibilidade, pelas críticas construtivas, por toda a compreensão e palavras de motivação.

À Professora Maria Manuela Vieira pela inspiração, pela orientação e por ter depositado em mim confiança para a realização desta dissertação.

Ao Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA) por me ter recebido no âmbito da Bolsa de Integração de Integração na Investigação Científica e Desenvolvimento, e à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (ESTSP) por proporcionar oportunidades como esta aos seus alunos.

Ao Instituto Politécnico do Porto e ao Santander Totta, pelo apoio financeiro prestado na realização da Bolsa de Integração na Investigação Científica e Desenvolvimento (BInt-ICD/IPP-BST/CISA/01/2015).

À Professora Piedade Barros pela disponibilização das estufas de culturas, e pelo apoio num outro âmbito profissional.

Às Professoras Anabela Fernandes e Matilde Rodrigues por todo o apoio numa fase inicial de realização do presente trabalho.

À D. Lurdes e à D. Jerónima, funcionárias da ESTSP, por todo o auxílio na lavagem e esterilização do material de laboratório utilizado.

Ao meu namorado por todo o apoio incondicional e pelo incentivo constante.

À minha afilhada, que através do amor tão particular que as crianças conseguem transmitir, fortalece-me todos os dias.

Aos meus pais e irmão por toda a paciência, ajuda e motivação, mesmo que na fase mais difícil das nossas vidas. Dedico esta tese à nossa força e união.

I. Resumo

Nos sistemas de abastecimento e distribuição de água para consumo humano, as superfícies internas das torneiras podem estar em contacto direto com água não-estéril, potenciando o desenvolvimento de biofilmes. Os biofilmes podem alojar diversos microrganismos patogénicos, facto que representa um potencial fator de risco de doenças associadas à ingestão de água. A integridade dos sistemas de abastecimento e distribuição de água é particularmente crítica em estabelecimentos utilizados por grupos de risco (p.ex., escolas), devendo ser monitorizada regularmente. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade da água, assim como os riscos associados à presença de biofilmes em torneiras de espaços escolares.

A amostragem foi realizada em torneiras de casas de banho, cantinas e bebedouros de sete escolas, num total de trinta e seis amostras de água, trinta e três superfícies internas de torneiras, e vinte e dois arejadores. Para ambas as amostras, água e superfícies, foram avaliados os seguintes parâmetros: Bactérias Coliformes, *Escherichia coli*, Número de colónias a 22°C e 37°C, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus coagulase positiva*. O cloro residual livre, pH e a temperatura foram igualmente determinados nas amostras de água. Foi também analisado o estado de higiene de vinte e nove superfícies internas de torneiras através do método de deteção de Adenosina Trifosfato (ATP) por bioluminescência.

Na generalidade as amostras de água cumpriam as recomendações legais, à exceção do número de colónias a 22°C e 37°C (30,6% e 19,4%, respetivamente), e cloro residual livre (8,3% <0,2mg/L e 47,2% >0,6 mg/L). Na avaliação microbiológica das superfícies internas das torneiras observou-se contagens elevadas do número de colónias a 22°C (de 5×10^1 a 6×10^6 UFC [unidades formadoras de colónias]/unidade de amostragem) e 37°C (de $4,5 \times 10^1$ a $6,2 \times 10^6$ UFC/unidade amostragem) em 66,7% e 72,7% das amostras, respetivamente, e 86,4% e 100% dos arejadores, respetivamente. Neste último ponto de amostragem foi também detetado *Clostridium perfringens*, Bactérias coliformes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus coagulase positiva* em 13,6%, 9,1%, 9,1%, 4,5% e 18,2% das amostras, respetivamente. A análise de ATP evidenciou uma higienização débil em 17,2% das torneiras.

Estes resultados indicam a presença de biofilmes nas superfícies internas e arejadores de torneiras, sugerindo deficiências na integridade dos sistemas de abastecimento e distribuição de água em algumas escolas. No presente estudo, *Staphylococcus* coagulase positiva foram encontrados simultaneamente nas amostras de água, superfícies internas das torneiras e arejadores, o que sugere que os biofilmes parecem representar um fator de risco para a qualidade da água. A definição de planos de higienização das superfícies internas das torneiras e arejadores poderá ser uma forma de minimizar a presença biofilmes que alojam bactérias patogénicas oportunistas que parecem provir do utilizador.

Palavras-chave – Biofilmes; Desinfecção da água; Contaminação microbiológica; Qualidade da água para consumo humano; Sistemas de abastecimento e distribuição de água; Torneiras.

II. Abstract

In drinking water distribution systems, the inner surfaces of the taps may be in direct contact with non-sterile water, which can promote the development of biofilms. The biofilms can harbor several opportunistic pathogens, which represent a potential risk factor for waterborne diseases. The integrity of the water distribution systems is particularly critical in establishments used by vulnerable groups (e.g. schools) and should be monitored regularly. The aim of this study was to evaluate the water quality, as well as the risks associated with the presence of biofilms in taps of schools.

The sampling was performed in taps of bathrooms and canteens and drinking fountains of seven schools, for a total of thirty-six water samples, thirty-three internal surfaces of taps, and twenty-two aerators/flow straighteners. For both samples, water and surfaces, the following parameters were assessed: Coliform bacteria, *Escherichia coli*, Heterotrophic plate counts (HPC) at 22°C and 37°C, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* and coagulase-positive *Staphylococcus*. The free residual chlorine, pH and temperature were also determined in water samples. It was also analyzed the hygiene status of twenty-nine internal surfaces of taps using the method of detection of Adenosine Triphosphate (ATP) by bioluminescence.

In general, the water samples complied with legal requirements, except for HPC at 22°C and 37°C, (30.6% and 19.4%, respectively) and free residual chlorine (8.3% <0.2 mg/L and 47.2% >0.6 mg/L). The microbiological evaluation of the inner surfaces of taps showed high counts of HPC at 22°C (5×10^1 to 6×10^6 CFU [colony-forming units]/unit sample) and 37°C (4.5×10^1 to 6.2×10^6 CFU /unit sample) in 66.7% and 72.7% of samples, respectively, and 86.4% and 100% of flow straighteners, respectively. In the latter sample point, it was also detected *Clostridium perfringens*, coliform bacteria, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and coagulase-positive *Staphylococcus* in 13.6%, 9.1%, 9.1%, 4.5% and 18.2%, respectively. The analysis of ATP showed a weak cleansing in 17.2% of the taps. These results indicate the presence of biofilms in the internal surfaces and aerators/flow straighteners of taps, suggesting deficiencies in the integrity of the water supply and distribution systems in some schools.

In the present study, coagulase-positive *Staphylococcus* was found simultaneously in water samples, internal surfaces of the taps and aerators/flow straighteners, which suggests that biofilms seems to represent a risk factor for water quality. The definition of sanitation plans for the internal surfaces of taps and aerators/flow straighteners could be a practice to minimize the presence of biofilms, which can harbor opportunist pathogenic bacteria that seem to derive from the users.

Keywords: Biofilms; Drinking water distribution systems; Drinking water quality; Microbiological contamination; Taps; Water disinfection.

III. Índice

AGRADECIMENTOS.....	I
I. RESUMO	III
II. ABSTRACT	V
III. ÍNDICE	VII
IV. ÍNDICE DE ABREVIATURAS/ ACRÓNIMOS/ SIGLAS.....	X
V. ÍNDICE DE TABELAS	XI
VI. ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS.....	2
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. GESTÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS.....	4
2. REGIME DA QUALIDADE DA ÁGUA DESTINADA AO CONSUMO HUMANO	5
3. SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO	7
3.1 A utilização do cloro como agente desinfetante.....	11
4. FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM SISTEMAS DE ABASTECIMENTO E DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA	13
4.1 Fatores que influenciam a formação de biofilmes.....	14
4.2 Potenciais consequências da formação de biofilmes	16

5. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO.....	17
5.1 Parâmetros físico-químicos.....	17
5.2 Parâmetros microbiológicos	19
5.2.1 Bactérias Coliformes	19
5.2.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	19
5.2.3 Número de colónias a 22°C e 37°C.....	21
5.2.4 <i>Clostridium perfringens</i> , incluindo esporos.....	22
5.2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
5.2.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	24
6. AVALIAÇÃO DO ESTADO DE HIGIENE POR MÉTODOS RÁPIDOS.....	26
CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	28
2. PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM	29
2.1 Amostragem de água para análise microbiológica	29
2.2 Amostragem de arejadores e superfícies de torneiras para análise microbiológica.....	29
2.3 Amostragem de arejadores e superfícies internas das torneiras para análise de ATP.....	31
3. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	31
3.1 Temperatura.....	31
3.2 pH	32

3.3 Cloro	32
4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	32
5. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	32
CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
1. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	36
2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS SUPERFÍCIES INTERNAS DAS TORNEIRAS E AREJADORES	40
3. ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS SUPERFÍCIES INTERNAS DAS TORNEIRAS.....	44
4. RISCOS ASSOCIADOS PELA PRESENÇA DE BIOFILMES NAS TORNEIRAS E AREJADORES E A SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE DA ÁGUA.....	46
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

IV. Índice de Abreviaturas/ Acrónimos/ Siglas

AHA - Ácidos haloacéticos

ARSN – Administração Regional de Saúde do Norte

ATP – Adenosina Trifosfato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DGS - Direção Geral de Saúde

ERSAR – Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos

ETA – Estação de Tratamento de Água

EPA – *Environmental Protection Agency*

HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Point*

INE – Instituto Nacional de Estatística

IRAR – Instituto Regulador de Águas e Resíduos

ISO – *International Organization of Standardization*

MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

PORDATA – Base de Dados Portugal Contemporâneo

PCQA - Programa de Controlo da Qualidade da Água

PVSACH - Programa de Vigilância Sanitária de Águas para Consumo Humano

RLU – *Relative Light Units*

RNA – Ácido Ribonucleico

WHO – *World Health Organization*

THM – Trihalometanos

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

UNICEF - *United Nations Children's Fund*

V. Índice de Tabelas

Tabela 1. Características das escolas amostradas: idade e regime de funcionamento dos edifícios, método de aquecimento de água e disponibilidade de bebedouros nos recreios.....	28
Tabela 2. Metodologia utilizada na análise microbiológica de água, superfícies internas das torneiras e arejadores.....	34
Tabela 3. Parâmetros microbiológicos obtidos nas análises de amostras de água (N= 36), e percentagem de amostras não conformes.....	36
Tabela 4. Parâmetros físico-químicos obtidos nas análises de amostras de água (N= 36), e identificação das escolas e da percentagem de amostras não conformes, considerando o valor paramétrico.....	38
Tabela 5. Valores obtidos na análise microbiológica das superfícies internas das torneiras e arejadores, percentagem de amostras positivas e identificação das escolas.....	40
Tabela 6. Valores obtidos na análise de bioluminescência nas amostras das superfícies internas das torneiras, percentagem de amostras com valores superiores ao de referência, e identificação das escolas.	44
Tabela 7. Resumo dos resultados não conformes/positivos obtidos para os parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de água, superfícies internas das torneiras e arejadores das diferentes escolas amostradas.....	46
Tabela 8. Microrganismos patogénicos oportunistas potencialmente transmitidos pela água, sua persistência nos sistemas de abastecimento e distribuição de água, e infecciosidade relativa considerando a via de infeção. Adaptado de WHO, 2006 - Guidelines for Drinking-water Quality, Recommendations.	50

VI. Índice de Figuras

Figura 1. Etapas de um sistema de abastecimento de água para consumo humano.	8
Figura 2. Percentagem relativa às classes de qualidade de águas superficiais utilizadas para abastecimento público em Portugal Continental (ano de 2009). Adaptado de INE (2012).	9
Figura 3. Arejadores de torneiras.	30
Figura 4. A) Torneira com arejador amovível. B) Torneira sem arejador. C) Torneira com arejador integrado.....	31

Introdução

A água representa um bem essencial à manutenção da vida, pelo que deve ser acessível à comunidade, e apresentar condições de potabilidade como ser salubre, limpa e isenta de qualquer perigo para a saúde pública (WHO, 2003a; artigo 8º do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto). Geralmente é distribuída à sociedade por sistemas de abastecimento público, que têm obrigatoriedade de controlar a qualidade da água para consumo humano, atividade enquadrada legalmente em Portugal pelo Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto.

No entanto, os parâmetros estabelecidos legalmente para a avaliação da qualidade da água, por si só, podem não traduzir todos os riscos associados ao consumo da mesma. Nas superfícies das canalizações podem ser formados biofilmes que possuem uma grande diversidade microbiológica e são compostos essencialmente por bactérias, onde se podem alojar microrganismos patogénicos que não são detetados e/ou comumente pesquisados nas amostras de controlo da qualidade da água (Flemming *et al.*, 2002; Berry *et al.*, 2006; Wingender & Flemming, 2011; Simões & Simões, 2013). Desta forma, o controlo da qualidade da água, pode não refletir uma possível presença de biofilmes nos sistemas de abastecimento e distribuição.

Em situações de pressão exercida pelo fluxo de água sobre as canalizações, a integridade dos biofilmes é comprometida uma vez que partes dos mesmos podem soltar-se para a água, e conseqüentemente originar várias ameaças à saúde pública. Caso seja ingerida, pode comprometer a saúde dos consumidores, principalmente indivíduos mais vulneráveis como crianças, idosos ou imuno-deficitários (WHO, 2006; Wingender & Flemming, 2011). Para além disso, através do contacto, pode ocorrer a disseminação de microrganismos para outros locais e constituir outros focos de contaminação.

A avaliação da qualidade da água é largamente executada e alvo de diversos estudos, no entanto a análise de biofilmes no contexto de sistemas de abastecimento e distribuição não é tão explorada. As torneiras são o último ponto do sistema de distribuição até ao consumidor, e são utilizadas muitas vezes pelas crianças para beber diretamente. Esta situação pode ser problemática pela possível transmissão bidirecional de microrganismos, potencialmente patogénicos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivos

O objetivo geral deste estudo consistiu na avaliação da qualidade da água para consumo humano considerando os riscos associados à presença de biofilmes em torneiras de espaços escolares.

A presente dissertação é composta por três capítulos. No Capítulo I será apresentada uma revisão bibliográfica do tema, com a abordagem de vários assuntos pertinentes, desde o enquadramento legal da qualidade da água destinada ao consumo humano, à formação de biofilmes e repercussões associadas à sua presença em sistemas de abastecimento e distribuição de água. O Capítulo II irá expor os materiais utilizados bem como as metodologias adotadas no procedimento experimental deste trabalho. Finalmente, no Capítulo III serão apresentados e discutidos os resultados obtidos em relação à análise microbiológica e físico-química das amostras de água, à análise microbiológica das superfícies internas das torneiras e arejadores, e à análise bioquímica das superfícies internas das torneiras e arejadores, e apuradas as principais conclusões do estudo.

CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica

1. Gestão dos recursos hídricos

Na Declaração Universal dos Direitos Humanos de 1948 são definidos respetivamente nos artigos 3º e 25º os direitos à vida, e a viver com saúde e bem-estar (United Nations, 1949). A água tem uma importância vital, e é utilizada diariamente para satisfação de várias necessidades básicas como a ingestão, a alimentação e a higiene, devendo por isso, ser acessível, disponível à comunidade e própria para consumo humano.

De 1990 a 2015, 2,6 milhões de indivíduos passaram a utilizar fontes de água potável, contudo 663 milhões, habitantes sobretudo de zonas rurais, continuam privados deste direito. Atualmente têm acesso a água potável, 96% da população urbana e 84% da população rural (UNICEF & WHO, 2015). A utilização de água não potável causa várias adversidades à saúde, como as doenças diarreicas que são responsáveis pelo maior número de mortes com origem na água, sendo em grande maioria crianças com menos de cinco anos, habitantes de países em desenvolvimento (WHO, 2003a). De 1990 a 2012 a mortalidade provocada por doenças diarreicas desceu de 2,9 milhões para 1,5 milhões de mortes (WHO, 2014).

Como recurso natural de extrema importância, torna-se fulcral a sua gestão de forma sustentável. Em Portugal, a Lei n.º 58/2005 de 29 de dezembro, alterada e republicada pelo Decreto-Lei n.º 130/2012 de 22 de junho, que transpõem para a ordem jurídica nacional a Diretiva Quadro da Água (Diretiva n.º 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro), aprova a **Lei da Água** e estabelece as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas.

A referida Lei define princípios de gestão da água, para além dos designados na Lei de Bases do Ambiente, como o valor social da água, a gestão integrada das águas e dos ecossistemas, a dimensão ambiental, entre outros (artigo 3º do Decreto-Lei n.º 130/2012 de 22 de junho).

Para o planeamento e gestão das águas, a unidade utilizada é a Região Hidrográfica, baseada na respetiva Bacia Hidrográfica. Portugal possui dez Regiões Hidrográficas: Minho e Lima (RH1), Cávado, Ave e Leça (RH2), Douro (RH3), Vouga, Mondego, Lis e

Ribeiras do Oeste (RH4), Tejo (RH5), Sado e Mira (RH6), Guadiana (RH7), Ribeiras do Algarve (RH8), Açores (RH9), Madeira (RH10), sendo que as regiões hidrográficas do Minho e Lima, do Douro, do Tejo e do Guadiana, compartilham bacias hidrográficas com Espanha (artigo 6º do Decreto-Lei n.º 130/2012 de 22 de junho).

A Agência Portuguesa do Ambiente, I.P. é a entidade que assume funções de Autoridade Nacional da Água, para aplicação da Lei da Água.

2. Regime da qualidade da água destinada ao consumo humano

Em Portugal, a qualidade da água destinada ao consumo humano é regida pelo **Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto**. Este procede à revisão do Decreto-Lei n.º 243/2001 de 5 de setembro, que transpõe a Diretiva n.º 98/83/CE, do Conselho de 3 de novembro para ordem jurídica interna. A autoridade competente pela coordenação e fiscalização da aplicação do referido Decreto-Lei é a **Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos** (ERSAR), anteriormente designada de Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR).

No artigo 2º do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto são enunciados entre outros, as responsabilidades das entidades gestoras, a classificação dos sistemas de abastecimento e a função das redes de distribuição. As **entidades gestoras** são responsáveis pela exploração e gestão de um sistema de abastecimento público de água para consumo humano, garantindo o cumprimento dos requisitos explícitos no Decreto-Lei, e assegurando que a água seja salubre, limpa e equilibrada. Os **sistemas de abastecimento público** englobam os equipamentos e infraestruturas desde a captação da água até à sua distribuição. Podem ser classificados como **sistemas de abastecimento público em alta**, que executam o represamento, a captação, a elevação, o tratamento, o armazenamento e a adução de água, e **sistemas de abastecimento público em baixa**, responsáveis pelo armazenamento, elevação e distribuição de água para consumo. Esta distribuição da água desde os reservatórios, captações ou estações de tratamento de água até aos ramais de ligação é feita através da **rede de distribuição** composta por todas as tubagens e acessórios envolvidos. Os **sistemas de distribuição prediais** englobam as canalizações, acessórios e aparelhos desde os ramais de ligação até às torneiras dos consumidores.

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

De acordo com o artigo 10º do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto a verificação da conformidade dos pressupostos da legislação é feita através do controlo da qualidade da água e do cumprimento dos valores paramétricos fixados para os critérios definidos. Nas situações de água distribuída pela rede pública, a referida verificação é executada no interior de uma instalação ou estabelecimento numa torneira onde a água retirada seja utilizada para consumo. Em situações que se comprove que o incumprimento dos valores paramétricos é atribuível ao sistema de distribuição predial ou à sua manutenção, a responsabilidade não é da entidade gestora, exceto em instalações em que a água é fornecida ao público como **escolas** e **hospitais**. Neste caso, a entidade gestora tem que informar os responsáveis do estabelecimento ou instalação, a autoridade de saúde e a autoridade competente, a ERSAR. A autoridade competente, consultando se necessário a autoridade de saúde, pode apresentar ao responsável da instalação, medidas e prazos para resolução da situação, informando as entidades gestoras envolvidas. Não sendo resolvida a situação de incumprimento, e caso esteja em risco a saúde pública, a entidade competente considerando o parecer da autoridade de saúde pode ordenar a suspensão do abastecimento de água.

Anualmente as entidades gestoras têm de elaborar um **Programa de Controlo da Qualidade da Água (PCQA)** que tem que ser aprovado pela entidade competente (artigo 14º do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto). O controlo da qualidade da água engloba controlos de rotina e controlos de inspeção, tendo uma frequência mínima de amostragens definida mediante o volume de água fornecida na zona de abastecimento (anexo II do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto).

De acordo com o artigo 6º, anexo I e anexo II do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto, com os **controlos de rotina** pretende-se obter de forma regular informações sobre a qualidade organolética e microbiológica da água, para avaliar a eficácia do tratamento. São avaliados parâmetros como *Escherichia coli*, Bactérias Coliformes, Desinfetante Residual, Número de Colónias a 22°C e 37°C, *Clostridium perfringens*, pH, Cheiro e Turvação. O **controlo de inspeção** tem como finalidade a verificação do cumprimento dos valores paramétricos fixados no referido Decreto-Lei, relativos a parâmetros microbiológicos, químicos e indicadores. Os dados da qualidade da água devem ser

publicados para consulta pública, e enviados à respetiva autoridade de saúde (artigo 17º do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto).

A **vigilância sanitária** da água para consumo humano fornecida pelas entidades gestoras é assegurada pela Autoridade de Saúde, que deve, entre outras funções, realizar a avaliação de risco para a saúde pública considerando a qualidade da água, e executar análises complementares ao PCQA (artigo 30º do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto). Neste âmbito, o Departamento de Saúde Pública da Administração Regional de Saúde elabora um documento com orientações para a execução do **Programa de Vigilância Sanitária de Águas para Consumo Humano (PVSACH)** na sua área de atuação.

Este programa engloba três vertentes: (1) a **higio-sanitária e tecnológica** referente à verificação das condições de higiene e segurança e técnico-operativas das infraestruturas e do funcionamento, bem como das medidas de gestão e manutenção da qualidade da água e dos equipamentos; (2) a **analítica**, relativa à realização de análises para avaliação da qualidade da água, e à verificação do cumprimento do PCQA; e (3) a **epidemiológica**, que compara e interpreta informações obtidas por diversos programas para a avaliação do risco que o consumo da água pode comportar para a população (ARSN, 2013).

3. Sistemas de tratamento de água para consumo humano

A água para consumo humano, até ser distribuída à população, é submetida a várias etapas ao longo do sistema de abastecimento. A água é captada, sujeita a tratamento numa **Estação de Tratamento de Água (ETA)**, que associa vários processos (e.g., coagulação, floculação, sedimentação e desinfecção) que garantem a sua qualidade, seguidamente é armazenada em reservatórios e por último distribuída para abastecimento da população (Figura 1).

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

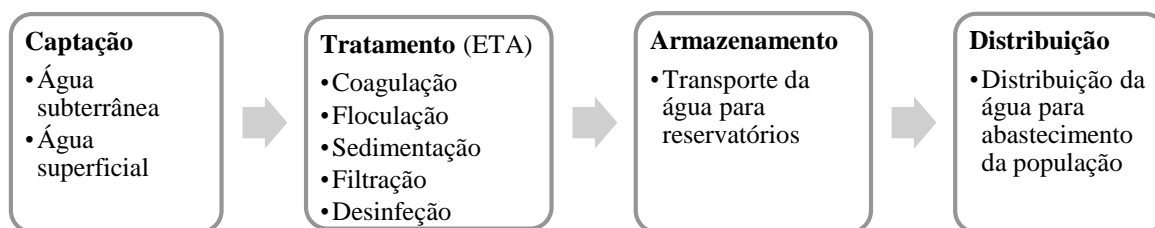


Figura 1. Etapas de um sistema de abastecimento de água para consumo humano.

A primeira etapa, a captação, consiste na recolha da água que pode ser de origem superficial ou subterrânea. A **água subterrânea** encontra-se em reservas comumente designadas de aquíferos, onde é acumulada por consequência da infiltração da água da chuva e que ao atravessar várias camadas de solo vai sofrendo filtração (Paixão, 1999). Geralmente tem melhores propriedades que a água superficial, sendo menos vulnerável a contaminação e por isso livre da maioria de patógenos, que quando ocorrem têm normalmente origem na superfície da terra devido a atividades industriais, agrícolas ou pecuárias (Ojo *et al.*, 2012).

As **águas superficiais**, provenientes de rios, lagos e albufeiras, estão disponíveis em maior quantidade, no entanto têm índices de qualidade mais baixos devido à contaminação a que estão sujeitas, necessitando assim geralmente, de mais processos de tratamento em relação às águas subterrâneas (Paixão, 1999; Li *et al.*, 2016).

As águas mais utilizadas para consumo são as superficiais, cujas classes de qualidade e valores inerentes (ano 2009) apresentam-se na Figura 2 (INE, 2012). Cerca de 14% das águas superficiais apresentam uma qualidade indesejável classificada como “Má” ou “Muito Má” e cerca 77,8% apresentam uma qualidade da água aceitável, no entanto desse valor, apenas 36,1% é referente a “Excelente” ou “Boa”, sendo a maior percentagem relativa a uma qualidade da água “Razoável” com 41,7%.

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

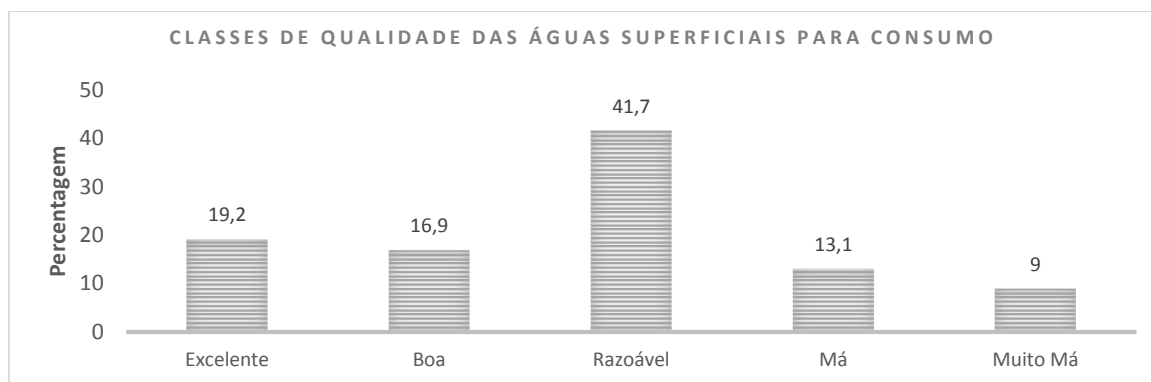


Figura 2. Percentagem relativa às classes de qualidade de águas superficiais utilizadas para abastecimento público em Portugal Continental (ano de 2009). Adaptado de INE (2012).

Em 1991, 80% da população portuguesa era servida por sistemas públicos de abastecimento e distribuição de água, valor que subiu para 96% em 2009 (PORDATA, 2015). O tratamento da água para consumo humano numa ETA depende da sua origem.

Relativamente ao tratamento da água para consumo, os processos mais utilizados são: (1) coagulação; (2) floculação; (3) sedimentação; (4) filtração; e (5) desinfecção. A **coagulação** ocorre devido à adição de sais de alumínio ou ferro na água que provocam a agregação das partículas coloidais em suspensão, que ao colidirem umas com as outras vão aumentando de tamanho, formando-se assim flocos, processo designado de **floculação** (Matilainen *et al.*, 2010; Moghaddam, *et al.*, 2010). Por ação da gravidade, ocorre a **sedimentação**, que consiste na deposição dos flocos no fundo de um tanque, separando-se assim da água e diminuindo consideravelmente a turbidez da mesma (EPA, 2016a). No interior dos flocos ou partículas coloidais torna-se mais difícil a ação dos desinfetantes o que pode estimular o crescimento bacteriano, sendo assim importante a redução da turbidez da água (WHO, 2011). Posteriormente, ocorre a **filtração**, processo no qual a água percorre filtros compostos por materiais porosos, normalmente areia, apropriados para a retenção de partículas de menor dimensão que possam ainda estar em suspensão na água (Fret *et al.*, 2016). Por fim procede-se à **desinfecção**, onde é aplicado um agente desinfetante, importante para diminuir o número de microrganismos, manter um teor de desinfetante residual, e impedir a proliferação de microrganismos patogénicos (Mi *et al.*, 2015).

Os agentes desinfetantes utilizados podem ser físicos como a radiação ultravioleta (UV), ou químicos como por exemplo o ozono e o cloro.

A **radiação UV** é emitida por baixa pressão e tem ação biocida que inativa protozoários, bactérias, bacteriófagos, leveduras, vírus, fungos e algas. No entanto, a sua ação pode ser inibida pela turvação da água uma vez que esta pode impedir que os microrganismos sejam expostos à radiação UV (WHO, 2011). A sua utilização pode inativar *Cryptosporidium* e *Giardia*, mas não é eficaz em todos os patogénicos. Este agente desinfetante penetra na parede celular e atua no genoma dos microrganismos impedindo a síntese de Ácido Ribonucleico (RNA) e a replicação de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (Guerrero-Latorre *et al.*, 2016). A utilização de radiação UV tem a vantagem de não formar produtos tóxicos na água (ao contrário do ozono e do cloro), porém não possibilita um efeito de proteção residual na água devendo assim ser aplicado um desinfetante secundário (EPA, 2003).

O **ozono gasoso** (O₃), geralmente utilizado como desinfetante primário, é um poderoso oxidante que reage com substâncias químicas orgânicas presentes na água, aumentando a sua biodegradabilidade e facilitando o processo de coagulação/floculação. Em termos de vantagens, o O₃ necessita de menor concentração e menos tempo de contacto do que outros desinfetantes, como por exemplo o cloro, para executar a desinfecção microbiológica, e reduz a possibilidade de produção de subprodutos clorados como os trihalometanos, podendo, no entanto, ser formados compostos como ácidos carboxílicos resultantes da reação entre o ozono e a matéria orgânica natural (Papageorgiou *et al.*, 2014). A sua utilização é importante na resolução de problemas de odor e sabor das águas produzidos pelo composto 2-Metil-isoborneol sintetizado por vários microrganismos, que é removido pelo ozono (Audenaert *et al.*, 2010). É mais eficaz que o cloro na inativação de vírus, *Cryptosporidium* e *Giardia*, no entanto tem como desvantagem o facto de ser tóxico e corrosivo, o que dificulta a sua utilização e requer sistemas de ozonização complexos (EPA, 2003). Além disso, o ozono, não fornece um teor de desinfetante residual, havendo por isso a necessidade de uma posterior adição de cloro para garantir a qualidade da água ao longo do sistema de distribuição (WHO, 2011).

Atualmente, o desinfetante mais utilizado é o **cloro** pela sua eficácia e permanência na água para além do momento de injeção, uma vez que mantém concentrações residuais ao longo da rede de distribuição de água, controlando assim potenciais contaminações, e prevenindo doenças infecciosas de origem hídrica (WHO, 2011).

3.1 A utilização do cloro como agente desinfetante

O cloro é utilizado sob a forma de **cloro gasoso** (Cl_2), **hipoclorito de sódio** (NaClO) ou **hipoclorito de cálcio** ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), que em contacto com a água se dissociam em ião hipoclorito (ClO^-) e ácido hipocloroso (HOCl), tendo este último um efeito germicida 100 vezes superior ao primeiro (IRAR, 2007; WHO, 2011).

Para a escolha do tipo de cloro a utilizar, deve ser considerada a quantidade de desinfetante necessária, a facilidade de operação, o custo associado, as condições de armazenamento e segurança. Sendo mais económico, o cloro gasoso é mais utilizado em grandes instalações, o hipoclorito de sódio em instalações mais pequenas uma vez que é de aplicação mais fácil, e o hipoclorito de cálcio aplicado normalmente quando não existe energia elétrica no local de injeção (IRAR, 2007).

São vários os fatores que podem influenciar a eficácia do cloro: (1) concentração, (2) temperatura da água, (3) concentração hidrogeniônica (pH), (4) tempo de contacto, (5) extensão da rede e (6) o estado de conservação das condutas (IRAR, 2007).

A **concentração** de cloro necessária varia mediante a resistência dos microrganismos a eliminar, no entanto deve ser sempre garantido um teor de cloro residual livre ao longo de todo o sistema de distribuição (IRAR, 2007).

A **temperatura** tem influência na cinética de inativação patogénica, aumentando o poder desinfetante do cloro com o aumento da temperatura da água, tornando-se mais eficaz na eliminação de microrganismos como protozoários (e.g., *Giardia*) e vírus (EPA, 2003; IRAR, 2007). No entanto, a temperaturas mais elevadas o crescimento bacteriano é estimulado, situação que potencia a formação de subprodutos do cloro como os

trihalometanos (THM) e os ácidos haloacéticos (AHA) que resultam da reação do desinfetante com matéria orgânica (EPA, 2003; IRAR, 2007).

O **pH** da água interfere com o desempenho do cloro na desinfecção, na medida em que águas alcalinas (pH mais alto) necessitam de concentrações mais elevadas de cloro residual livre e um tempo de contacto maior (WHO, 2006). Um pH mais baixo contribui para uma desinfecção mais eficaz devido à predominância de HOCl, em detrimento de ClO^- , ião que ocorre mais frequentemente em águas com pH alto e provoca uma diminuição na eficácia da desinfecção (IRAR, 2007). Apesar de a um pH mais baixo a inativação de protozoários e vírus ser mais eficaz, e ser reduzida a possibilidade de formação de subprodutos de cloro, podem surgir problemas como a corrosão de materiais no sistema de distribuição ou a precipitação de algumas substâncias inorgânicas (EPA, 2003). Associado à corrosão dos materiais torna-se suscetível a migração de metais provenientes das canalizações e tubos para a água de consumo, desencadeando a potencial exposição humana (WHO, 2007).

O **tempo de contacto** é uma estimativa do tempo necessário de detenção da água num local onde ocorre a injeção do cloro, para a desinfecção da mesma (EPA, 2003). Uma desinfecção eficaz requer no mínimo 30 minutos de **tempo de contacto** (IRAR, 2007).

A **extensão da rede** é importante na eficácia do cloro uma vez que ao longo da rede de distribuição o cloro é consumido ao reagir com substâncias presentes na água, e para evitar potenciais contaminações microbiológicas, devem existir postos de recloração (EPA, 2003; IRAR, 2007).

Relativamente ao **estado de conservação das condutas** são vários os fatores que favorecem o consumo do desinfetante residual livre podendo permitir contaminações na rede de distribuição, sendo eles: as hidrodinâmicas do fluxo (velocidade, período de residência), as características das tubagens (tipo de material, idade) bem como a presença/formação de biofilmes (IRAR, 2007).

4. Formação de biofilmes em sistemas de abastecimento e distribuição de água

Os sistemas de abastecimento e distribuição de água controlam regularmente a qualidade da mesma para garantir a sua potabilidade e não representar uma ameaça à saúde pública. Este controlo baseia-se na execução periódica de análises com a frequência estabelecida na legislação aplicável. No entanto, os resultados analíticos da qualidade da água podem não representar a situação real da rede de distribuição. A água proveniente dos sistemas de abastecimento e distribuição não é estéril e os processos de tratamento podem não remover totalmente os microrganismos, o que pode facilitar a proliferação dos mesmos ao longo da rede de distribuição (Sun *et al.*, 2014).

A água proveniente dos sistemas de abastecimento e distribuição não é estéril e os processos de tratamento podem não remover totalmente os microrganismos, o que pode facilitar a proliferação dos mesmos ao longo da rede de distribuição (Sun *et al.*, 2014). Os biofilmes são formados por um conjunto complexo de comunidades microbianas organizadas funcionalmente e envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, excretadas pelos próprios microrganismos, e que formam uma camada viscosa e gelatinosa (Mains, 2008; Simões & Simões, 2013). Estas substâncias são essencialmente biomoléculas como polissacarídeos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, glicopeptídeos, e lipopolissacarídeos que juntos formam uma espécie de glicocálix, importante para a manutenção da integridade do biofilme (Ma *et al.*, 2006; Cortes *et al.*, 2011).

As substâncias poliméricas extracelulares formam uma rede tridimensional que liga fortemente umas células às outras, o que auxilia na fixação dos biofilmes às superfícies tornando difícil a sua remoção mesmo perante tensões mecânicas (p. ex., hidrodinâmica do fluxo). Estas substâncias participam também na captação de nutrientes ambientais como carbono, azoto e fosfato e atuam como um sistema digestivo externo porque contêm enzimas extracelulares próximas das células, importantes para a digestão de macromoléculas e aquisição de nutrientes (Flemming & Wingender 2010).

Para além das substâncias poliméricas celulares, outro mecanismo tem extrema importância na formação de biofilme - o *quorum sensing*, que consiste num processo pelo qual ocorre comunicação e obtenção de informação entre bactérias sobre a densidade populacional no ambiente envolvente, através da segregação de sinais químicos, igualmente designados de auto-indutores (Keller & Surette, 2006). Ao longo do crescimento bacteriano são então libertados os auto-indutores, que quando atingem um nível limiar, são detetados pelas bactérias, que respondem alterando sua expressão genética (Reading & Sperandio, 2005). Este método de coordenação do comportamento das células, está envolvido em diversas situações como a sobrevivência em condições adversas ao seu crescimento, a regulação da expressão genética da virulência, a esporulação, a resistência a antibióticos e a formação de biofilme (Bai & Rai, 2011).

Os sinais químicos, na forma de moléculas de sinalização que influenciam a formação de biofilme são: (1) oligopéptidos produzidos por bactérias gram positiva como *Staphylococcus aureus*, (2) auto-indutor-2 (AI-2) segregado pelas bactérias gram negativa e gram positiva, e (3) N-acil-homoserina lactonas (AHLs) produzidas pelas bactérias gram negativa, por exemplo *Pseudomonas aeruginosa* (Keller & Surette, 2006; Jiang & Liu, 2012).

Os biofilmes têm a capacidade de resistir a agentes desinfetantes como o dióxido de carbono e o cloro, que apesar de reduzirem o número de bactérias na água, têm um efeito muito reduzido na concentração de bactérias presentes nos biofilmes (Bridier *et al.*, 2011). Assim, o número de bactérias na água pode não indicar necessariamente a presença ou ausência de biofilme. Flemming *et al.*, (2002) reportaram que apesar de apenas 5% das bactérias serem detetadas no controlo de qualidade da água, 95% podem estar nas superfícies das canalizações. Os valores microbiológicos dos biofilmes variam bastante: o número de células totais pode ser entre 10^4 a 10^8 células/cm², e o número de microrganismos heterotróficos entre 10^1 a 10^6 UFC/cm² (Wingender & Flemming, 2011).

4.1 Fatores que influenciam a formação de biofilmes

Vários fatores podem influenciar a formação e crescimento de biofilme, entre os quais: (1) as condições hidráulicas/ velocidade do fluxo da água, (2) a temperatura da água, (3) a

disponibilidade de nutrientes, (4) a concentração de desinfetante, (5) e os materiais que constituem os tubos do sistema de distribuição (Norton & Lechevallier, 2000; Zacheus *et al.*, 2001; Lehtola *et al.*, 2006; Wingender & Flemming, 2011; Inkinen, *et al.*, 2014).

As **condições hidráulicas** afetam o desenvolvimento e a manutenção do biofilme. O caudal da água é importante para o transporte de nutrientes, a adesão dos microrganismos às superfícies e seu desprendimento (Donlan, 2002; Stewart, 2012). Quando a velocidade do fluxo da água é baixa torna mais difícil a disponibilização de nutrientes e oxigênio aos microrganismos integrados nos biofilmes dificultando o seu crescimento, ao contrário do que acontece com uma velocidade de fluxo mais alta. Assim, uma velocidade de fluxo de água maior parece favorecer o crescimento microbiano, porém a força exercida sobre as superfícies pode provocar mais facilmente um desgaste e desprendimento de massa de biofilme (Gomes *et al.*, 2014).

A **temperatura da água** pode fazer variar a sua qualidade, sendo o crescimento microbiano favorecido a temperaturas mais altas, uma vez que as contagens microbianas mais elevadas ocorrem nos sistemas de água quente em comparação com os sistemas de água fria (Bagh *et al.*, 2004; WHO, 2011; Inkinen *et al.*, 2014).

A **disponibilidade de nutrientes** é proporcional à formação de biofilme, ou seja, quanto mais nutrientes existir, mais biofilme é formado (Wingender & Flemming, 2011). A fonte de nutrientes pode ser a água, no entanto, os próprios materiais das canalizações dos sistemas de abastecimento e distribuição, como os plásticos e os antioxidantes, fornecem compostos biodegradáveis que podem ser também uma fonte de nutrientes (Rogers *et al.*, 1994; Keevil, 2002).

A comunidade microbiana presente nos sistemas de abastecimento e distribuição de água pode também ser afetada pela **concentração do desinfetante** (EPA, 2002). Recentemente, Mi *et al.* (2015) estudaram o impacto do cloro em biofilmes, e concluíram que a dose é um fator relevante uma vez que em águas com doses mais baixas de desinfetante foi encontrada uma maior diversidade de microrganismos em biofilmes, ao contrário do que aconteceu em águas com doses de desinfetante mais altas que apresentavam menor quantidade de microrganismos (Mi *et al.*, 2015).

O tipo de **materiais que constitui os tubos** utilizados nos sistemas de abastecimento e distribuição de água parece também influenciar o desenvolvimento de biofilmes. A borracha quando utilizada em acessórios da rede de distribuição parece criar condições para o crescimento microbiano através do fornecimento de nutrientes. Kilb *et al.*, (2003) concluíram no seu estudo que válvulas com revestimento de borracha usadas na rede de distribuição apresentavam frequentemente um crescimento visível de biofilmes, mesmo nos casos em que tal não acontecia nas superfícies das tubagens. As amostras de água apresentavam bactérias coliformes, as mesmas que estavam presentes nas válvulas, e foram identificados vários microrganismos entre eles *Citrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Klebsiella oxytoca* e *Aeromonas hydrophila*. Também a libertação de fósforo pelo plástico parece potenciar o desenvolvimento de biofilme que ocorre de forma mais rápida em canalizações de plástico do que em canalizações de cobre (Lehtola *et al.*, 2004).

4.2 Potenciais consequências da formação de biofilmes

A presença de biofilmes pode alterar as propriedades organoléticas da água e causar degradação das tubagens do sistema de distribuição (Gomes, *et al.*, 2014). A fixação dos biofilmes nas superfícies dos sistemas de abastecimento e distribuição pode provocar a sua corrosão por degradação dos materiais da sua constituição como metais e polímeros, corrosão esta que por sua vez facilitará a aderência de mais microrganismos (Fang, *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2015).

Geralmente os biofilmes são compostos em maior número por bactérias, devido ao seu tamanho pequeno, taxa de crescimento, capacidade de adaptação e de produção de substâncias poliméricas extracelulares, podendo estar presentes embora em menor quantidade vírus, protozoários, algas e fungos (Simões & Simões, 2013).

Apesar das bactérias presentes nos biofilmes serem normalmente microrganismos ambientais não patogénicos, estes podem alojar microrganismos patogénicos que estejam presentes na água mesmo abaixo do limite de deteção, tornando-se uma fonte de contaminação da mesma, e consequentemente um problema de saúde pública (Berry *et al.*, 2006; Wingender & Flemming, 2011). Normalmente, partes de biofilmes desprendem-se das superfícies quando é exercida uma grande pressão, e são então libertados para a água.

A ingestão de água contaminada, o contacto com a pele, mucosas, olhos ou ouvidos ou inalação de aerossóis com agentes patogénicos pode provocar infeção, principalmente em pessoas mais vulneráveis como crianças, idosos ou imuno-deficitários (WHO, 2006; Wingender & Flemming, 2011).

A presença de biofilmes pode também reduzir a concentração de desinfetante disponível para a inativação de agentes patogénicos na água, uma vez que reage com o desinfetante (Berger *et al.*, 2000). Desta forma, e para assegurar os níveis de desinfetante necessários, por vezes é aumentada a dose de desinfetante, situação que pode ter outras repercussões para a saúde pública, tal como a potencial presença de subprodutos como os trihalometanos (THM) (EPA, 2002). As formas de exposição do consumidor a THM são a ingestão de água, o contacto dérmico, e a inalação p.ex. no chuveiro devido à sua volatilidade (WHO, 2006).

Devido ao seu carácter carcinogénico, e aos efeitos que comporta no sistema nervoso central, fígado, rins e coração (EPA, 2001a), os THM pertencem ao grupo de parâmetros químicos a analisar em águas para consumo humano, com um valor paramétrico de 100 $\mu\text{g/L}$ (Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto).

5. Parâmetros de avaliação da qualidade da água para consumo humano

A qualidade da água para consumo humano é caracterizada pela avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos, cujos valores paramétricos e recomendáveis encontram-se fixados no Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto.

5.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos frequentemente avaliados são o pH, a temperatura, e o valor de desinfetante residual que normalmente é o cloro. No entanto, para além dos referidos, são vários os parâmetros físico-químicos que devem ser avaliados, como p.ex. THM, nitratos, nitritos, chumbo, arsénio, turvação, condutividade.

5.1.1 pH

O pH ou potencial de hidrogénio, indica a acidez ou alcalinidade/basicidade de uma solução, numa escala de 0 a 14, tendo uma solução ácida um pH menor que 7, uma solução alcalina/básica um pH maior que 7, e uma solução neutra um pH igual a 7.

A maioria das águas potáveis têm um pH entre 6,5 e 8,5, valor que pode baixar com o aumento de concentração de dióxido de carbono (CO₂) na água (WHO, 2007). Recomendações internacionais referem que para um pH de 6-8 o cloro residual livre deve ser entre 0,4-0,5 mg/L, enquanto que a um pH entre 8-9 o valor de desinfetante deve ser aumentado para 0,6 mg/L, e a um pH superior a 9, a desinfecção por cloro pode ser ineficaz (WHO, 2006).

A legislação portuguesa, no Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, define para as águas de consumo humano, o valor paramétrico de $\geq 6,5$ e ≤ 9 unidades de pH.

5.1.2 Temperatura

A água para consumo humano deve apresentar uma temperatura semelhante à temperatura ambiente, ajustada à época sazonal. Não existe enquadramento legal que estabeleça valores paramétricos relativamente à temperatura da água para consumo humano.

No entanto, para além das águas frescas serem preferíveis para consumo, nas águas mais quentes torna-se mais difícil a manutenção da concentração de cloro residual devido à diminuição da sua estabilidade, situação que torna mais propício o crescimento microbiano, o aparecimento de problemas relacionados com a cor, sabor, odor da água e a corrosão das tubagens (WHO, 2011).

Este parâmetro deve ser medido no mesmo ponto de amostragem e em simultâneo com o desinfetante residual, uma vez que a eficácia deste último é sensível à temperatura (EPA, 2003).

5.1.3 Desinfetante residual

O desinfetante residual mais utilizado no tratamento de água potável é o cloro. Pela sua eficácia na desinfecção, mas também por garantir uma quantidade de desinfetante que permanece na água após o tratamento, representa uma proteção contra eventuais

contaminações futuras de pequena dimensão, garantindo assim, a distribuição de água com qualidade (WHO, 2003b; WHO, 2011).

O Decreto-Lei n.º 306/2007 não estabelece um valor paramétrico, no entanto recomenda um valor de cloro residual livre em águas para consumo humano, entre 0,2 e 0,6 mg/L.

5.2 Parâmetros microbiológicos

5.2.1 Bactérias Coliformes

Os coliformes incluem bactérias de origem fecal como o género *Escherichia*, e de origem não fecal ou ambiental. As bactérias de origem fecal fazem parte da flora intestinal do Homem e de outros animais de sangue quente, enquanto as de origem ambiental estão naturalmente presentes no solo e na água (WHO, 2006).

As bactérias coliformes são bacilos gram negativa, oxidase negativa, que podem ser aeróbias e anaeróbias facultativas e não formam esporos (Ferreira & Sousa, 2000). São capazes de formar colónias num meio seletivo e diferencial, com a fermentação de lactose e produção de ácido e gás a 36 ± 2 °C, 21 ± 3 h (ISO 9308-1, 2000; Mendes & Oliveira, 2004).

Este parâmetro é comumente utilizado como indicador da qualidade da água, pela sua sensibilidade à desinfeção (WHO, 2006).

O valor paramétrico estabelecido pelo Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto, relativo a Bactérias Coliformes em águas destinadas ao consumo humano, é de 0 N (Número) /100 mL.

5.2.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Sendo um coliforme de origem fecal cujo seu habitat natural é o trato intestinal do Homem e outros animais de sangue quente, está presente nas fezes, águas residuais e acidentalmente em alimentos mal lavados. Este microrganismo, da família *Enterobacteriaceae*, é usado no controlo da qualidade da água para consumo humano

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

como indicador de contaminação fecal recente, uma vez que a temperatura da água e a disponibilidade de nutrientes num sistema de abastecimento e distribuição não são suficientes para favorecer o crescimento de *E. coli* (WHO, 2006). A detecção deste parâmetro pode sugerir uma desinfecção ineficaz ou existência de ruturas (fendas) nas canalizações dos sistemas de abastecimento e distribuição (WHO, 2006).

E. coli é um bacilo, gram negativa, oxidase negativa, anaeróbio facultativo e não produtor de esporos. É uma bactéria coliforme termotolerante que fermenta a lactose a 35-37°C em menos de 48 horas, suporta temperaturas até 44±0.5°C e produz indol em meio de cultura de triptofano (WHO, 2001; Mendes & Oliveira, 2004).

A bactéria *E. coli* tem a facilidade de transitar para um estado viável mas não cultivável em situações adversas ao seu crescimento e desenvolvimento. Neste estado, as bactérias não crescem nos meios de cultura em que normalmente cresceriam pois apesar de se encontrarem vivas, apresentam níveis baixos de atividade metabólica, mas podem reverter na presença de condições ambientais desejáveis para o estado cultivável e estarem assim aptas para causar infecção (Oliver, 2010).

A ingestão de água contaminada com *E. coli* pode provocar infecção do trato intestinal, com vários sintomas associados dependendo da estirpe, podendo apresentar diarreia com sangue nas fezes, dores abdominais, vômitos e náuseas (Barroso *et al.*, 2014; Saxena *et al.*, 2015).

Entre as várias estirpes de *E. coli*, tais como a enteropatogénica (EPEC), enterotóxinogénica (ETEC) e enteroinvasiva (EIEC), a enterohemorrágica (EHEC), particularmente, o sorotipo O157:H7, transmitida geralmente por ingestão de água ou consumo de alimentos contaminados, é um importante patógeno relacionado a surtos de doenças gastrointestinais (Zhao *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2015). A *E. coli* O157:H7 produz toxinas responsáveis por diversos efeitos adversos na saúde dos indivíduos, como colite hemorrágica que provoca diarreia aquosa e ensanguentada, que nos casos em que se agrava pode desenvolver-se a síndrome hemolítico urémico cujas principais consequências são insuficiência renal e anemia hemolítica (Garg *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2015).

Para águas de consumo humano, o valor paramétrico de *E. coli* definido no Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto, é de 0 N/100 mL.

5.2.3 Número de colónias a 22°C e 37°C

Este parâmetro diz respeito a uma vasta gama de microrganismos heterotróficos como bactérias e fungos, que como fonte de carbono utilizam compostos orgânicos em vez de CO₂, bem como bactérias coliformes, e organismos formadores de esporos (WHO, 2006; Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2012). Estando presentes em vários tipos de água, solo, alimentos, vegetação e no ar (Allen, 2004), estes microrganismos podem desenvolver-se rapidamente, quer em água, quer em superfícies que contactam com ela, como nos biofilmes, sobretudo em situações de baixo teor de desinfetante, disponibilidade de nutrientes como o carbono orgânico assimilável, temperatura mais elevada e estagnação de água (WHO, 2002; WHO, 2006).

A temperatura representa um fator seletivo para este parâmetro. A uma temperatura moderada (22°C) crescem os microrganismos de origem ambiental, enquanto que a temperaturas mais altas (37°C) crescem os microrganismos fecais com origem humana ou em outros animais de sangue quente, bem como outras bactérias ambientais presentes no solo ou águas residuais que são capazes de se desenvolver a temperaturas mais altas, motivo pelo qual este parâmetro não é considerado um indicador de poluição fecal, mas sim um indicador de qualquer tipo de contaminação e deterioração da qualidade da água (Mendes & Oliveira, 2004; Sartory, 2004).

Geralmente estes microrganismos não apresentam uma importância significativa para a saúde pública, no entanto com a análise deste parâmetro podem ser incluídas bactérias patogénicas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, uma vez que são microrganismos heterotróficos, mas que são apenas distinguidos com a utilização de meios de cultura diferenciais (Allen, 2004).

As principais finalidades da análise deste parâmetro é a avaliação da higienização e integridade do sistema de distribuição, da eficácia do tratamento e desinfecção, bem como possível desenvolvimento de biofilmes (WHO, 2006; WHO, 2011).

Segundo o Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto, é definido como valor paramétrico a expressão “sem alteração anormal”, que significa que os valores obtidos na análise deste indicador não devem variar consideravelmente em relação ao histórico de análises; caso contrário, a entidade gestora deve apurar as respetivas causas de valores anómalos. Porém, é recomendável que o Número de colónias a 22°C e 37°C não exceda respetivamente 100 N/mL e 20 N/mL.

Variações nos valores destes parâmetros, acompanhados de alteração do odor e sabor da água, podem igualmente indicar a proliferação de biofilmes (WHO, 2003c).

5.2.4 *Clostridium perfringens*, incluindo esporos

Clostridium perfringens está presente no trato intestinal do Homem e outros seres vertebrados, é uma bactéria anaeróbia estrita, gram positiva, em forma de bastonete, sulfito redutora e formadora de esporos (Mendes & Oliveira, 2004).

Normalmente, está presente em águas residuais, não se multiplica em ambientes aquáticos, e é uma bactéria cujos esporos são resistentes inclusive ao processo de desinfecção. Permanecem, por isso, por longos períodos em locais contaminados evidenciando assim a sua presença, uma contaminação de origem fecal antiga, prolongada ou intermitente (Mendes & Oliveira, 2004; WHO, 2008).

Quando ingerido via água ou alimentos contaminados provoca gastroenterites, e quando contacta com feridas provoca gangrena gasosa, uma infeção grave dos tecidos que pode levar à morte (Brooks *et al.*, 2001).

O valor paramétrico definido no Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto, relativo à presença de *Clostridium perfringens* em águas para consumo humano é de 0 N/100 mL.

5.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria que está distribuída pela Natureza, nomeadamente no solo, água e plantas. Está presente, embora em número reduzido na flora intestinal e na pele do ser humano. É um patógeno oportunista que provoca infeções em

peessoas com sistema imunitário comprometido, tais como crianças, idosos e indivíduos hospitalizados (Brooks *et al.*, 2001).

É uma bactéria em forma de bastonete, gram negativa, catalase e oxidase positivas, aeróbias, não formadoras de endósporos. Têm mobilidade devido à presença de um único flagelo e produzem colónias de coloração esverdeada fluorescente devido à produção dos pigmentos pioverdina e piocianina, a uma temperatura de 37°C a 42°C (Ferreira & Sousa, 2000).

Pseudomonas aeruginosa tem a capacidade de resistir e crescer em biofilmes nos sistemas de abastecimento e distribuição de água potável, e representa a par de outras bactérias como a *Legionella pneumophila*, um dos patogénicos oportunistas mais relevantes associados a doenças relacionadas com a água (Wingender & Flemming, 2011).

A principal via de transmissão deste patogénico é pelo contacto com a pele (especialmente se lesionada), olhos e mucosas (WHO, 2006). Desta forma, para além da ingestão de água, contacto entre indivíduos e as superfícies das torneiras pode representar uma via de infeção (Boyle *et al.*, 2012). Numa unidade de cuidados intensivos foi observado um surto de *Pseudomonas aeruginosa* que foi transmitida ao paciente pela água, e cuja potencial fonte de contaminação identificada foi um filtro acoplado numa torneira que apresentava, ao fim de 31 dias de utilização, uma contaminação evidente e presença de *Pseudomonas aeruginosa* (Garvey *et al.*, 2016a). O mesmo estudo sugeriu que a contaminação das torneiras poderia ter origem na eliminação de águas residuais de pacientes nos lavatórios, e numa deficiente higienização das mesmas (Garvey *et al.*, 2016a).

Esta bactéria representa um grande problema em meio hospitalar pela capacidade de persistir em meios húmidos e contaminar equipamentos, assim como pela sua resistência a desinfetantes, antissépticos e antibióticos, o que facilita a sua disseminação. Em termos de efeitos provoca infeções no trato gastrointestinal, respiratório e urinário, e infeciona zonas do corpo com cateteres, feridas e queimaduras, podendo em doentes com outras patologias associadas como diabetes ou fibrose cística, provocar pneumonia e septicemia, situações que podem ser fatais (Barroso *et al.*, 2014).

A *Pseudomonas aeruginosa* tem também a capacidade de transitar para um estado viável mas não cultivável na presença de desinfetantes, falta de nutrientes ou temperatura de água desfavorável (Oliver, 2010). Esta situação representa uma agravante da sua presença em biofilmes nos sistemas de abastecimento e distribuição de água potável.

No Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto, é estabelecido um valor paramétrico de 0 N/250 mL apenas para águas colocadas à venda em garrafas ou outros recipientes, não sendo este parâmetro abordado na água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição.

5.2.6 *Staphylococcus aureus*

Esta bactéria faz parte da flora natural do corpo humano, estando presente na pele e nas mucosas: nariz, nasofaringe, orofaringe, olhos e intestino (Mendes & Oliveira, 2004). Apresenta uma forma esférica, que se agrupa e forma cachos, gram positiva, catalase positiva, anaeróbio facultativo e tem uma temperatura de crescimento entre os 18°C e os 40°C (Ferreira & Sousa, 2000).

Difere-se das restantes *Staphylococcus*, uma vez que produz coagulase, fator que representa patogenicidade para o Homem. A coagulase é uma proteína que coagula o plasma e reage com a protrombina no sangue. Os coágulos formados à volta das bactérias dificultam a sua ingestão por células fagocíticas, ação dos anticorpos e outros mecanismos de defesa (Brooks *et al.*, 2001).

Este parâmetro é particularmente preocupante em águas recreativas (p.ex., piscinas, banheiras de hidromassagem, etc) pela libertação do microrganismo do corpo humano para a água, ao contrário do que acontece nos sistemas de abastecimento e distribuição, onde apesar de ser detetada não está clara a sua transmissão pela ingestão de água (Mendes & Oliveira, 2004; WHO, 2006). No entanto, o contacto é a via de propagação de eleição, podendo ocorrer a infeção por *Staphylococcus* provocada por uma transmissão bidirecional do microrganismo entre os indivíduos e as superfícies da torneira (Knox *et al.*, 2015).

Especial relevância é prestada a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, internacionalmente conhecida por MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), que tal como *Staphylococcus aureus* sobrevivem em ambientes secos, e podem persistir muito tempo em superfícies tocadas por indivíduos (Lin *et al.*, 2016). As infecções provocadas por este agente são geralmente de origem hospitalar, no entanto, vários estudos já apontam a sua existência em ambientes não-hospitalares como escolas, parques e livrarias (Lin *et al.*, 2016). Mbogori *et al.*, (2013) detetaram no seu estudo, a presença de *Staphylococcus aureus* e MRSA nos puxadores das portas das salas de aula e das casas de banho, situação que representa uma potencial fonte de infeção para os estudantes, professores e funcionários.

São várias as patologias causadas por *Staphylococcus aureus* e podem ser provocadas por dois mecanismos diferentes: (1) pela produção de enzimas extracelulares e toxinas, que provocam gastroenterites ou intoxicações alimentares, com vômitos, febre, dores abdominais, diarreia; ou (2) pela multiplicação e disseminação da bactéria em tecidos, que provoca celulite infecciosa, furúnculos, abscessos, infeções de feridas cirúrgicas, bem como osteomielite, endocardite, pneumonia, ou septicemia, podendo demorar vários dias para o aparecimento dos sintomas (WHO, 2006; Barroso *et al.*, 2014).

Este parâmetro não é referido no Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto, não existindo assim valor paramétrico definido para água destinada a consumo humano. Relativamente à qualidade da água em piscinas, não existe em Portugal legislação específica, havendo apenas como referencial a Circular Normativa Nº 14/DA da DGS de 21/08/2009. Esta circular define o Programa de Vigilância Sanitária de Piscinas, onde estão apresentados valores de referência para vários parâmetros como os Estafilococos produtores de coagulase cujo valor limite de referência é de 0 UFC (Unidades Formadoras de Colónias) /100 mL, e o Número total de Estafilococos com um valor recomendável ≤ 20 UFC/100 mL.

6. Avaliação do estado de higiene por métodos rápidos

Legalmente estão apenas definidos valores paramétricos microbiológicos e físico-químicos para água de consumo humano, não existindo nenhuma regulamentação para as superfícies que contactam com a água (canalização, torneiras).

No entanto, existem métodos rápidos de análise da higienização das superfícies, como o de análise de Adenosina Trifostato (ATP), substância presente em todas as células vivas e seus resíduos orgânicos (O'Malley *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2016), detetada por bioluminescência.

Este método de leitura direta, prático e rápido, é largamente aplicado na indústria alimentar e restauração no âmbito da aplicação do sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (internacionalmente reconhecido como HACCP), e tem carácter essencial para a garantia da segurança alimentar (Carrascosa *et al.*, 2012). Este método tem uma vasta aplicabilidade, podendo ser utilizado em superfícies, equipamentos e seus operadores (O'Malley *et al.*, 2016).

Relativamente aos valores de referência, são várias as recomendações que existem, e que diversificam em função da utilização/finalidade da superfície em estudo. Murphy *et al.*, (1998) concluíram no seu estudo que superfícies limpas apresentam valores ≤ 100 RLU's; superfícies entre >100 – 150 RLU's têm uma limpeza deficiente (situação suspeita) e as superfícies com ≥ 150 RLU's são sujas. Os fabricantes de equipamentos de monitorização de bioluminescência geralmente consideram que superfícies limpas são as que apresentem valores ≤ 150 RLU's e as superfícies contaminadas com >150 RLU's (Carrascosa *et al.*, 2012).

CAPÍTULO II – Material e Métodos

1. Caracterização da amostra

O presente estudo envolveu a participação de sete escolas de três agrupamentos escolares pertencentes a uma cidade localizada no Norte Litoral de Portugal, designadamente seis Escolas Básicas de 1º Ciclo/Jardim-de-infância com crianças entre os 4 e os 10 anos de idade, identificadas no estudo de “A” a “F”, e uma Escola Básica de 2º e 3º Ciclo/Secundária, com estudantes de idades entre os 10 aos 18 anos identificada como “G”.

Na Tabela 1 são apresentados os dados relativos aos anos de edificação, regime de funcionamento, equipamentos associados ao aquecimento da água, assim como à presença/ausência de bebedouros nos estabelecimentos escolares amostrados. Quatro escolas encerram as atividades temporariamente no mês de agosto, enquanto as restantes funcionam durante todo ano. O aquecimento da água é garantido por cilindro, caldeira e/ou esquentador e todos os edifícios possuem água quente apenas nas zonas de balneário e refeitórios/cantina. No recinto exterior dos edifícios de cinco escolas estão disponíveis bebedouros para utilização da comunidade escolar. Todas as escolas possuem cantina e/ou refeitório.

Tabela 1. Características das escolas amostradas: idade e regime de funcionamento dos edifícios, método de aquecimento de água e disponibilidade de bebedouros nos recreios.

Escola	Anos de edificação	Regime de funcionamento	Aquecimento de água	Bebedouros nos recreios
A	21 a 40 anos	Funciona todo o ano	Esquentador	Sim
B	6 a 10 anos	Encerramento em agosto	Cilindro	Sim
C	≤ 5 anos	Encerramento em agosto	Caldeira	Sim
D	≥ 75 anos	Encerramento em agosto	Caldeira/cilindro	Não
E	11 a 20 anos	Funciona todo o ano	Cilindro/esquentador	Sim
F	≥ 75 anos	Encerramento em agosto	Cilindro	Sim
G	≤ 5 anos	Funciona todo o ano	Caldeira	Não

Em cada edifício escolar foram selecionados até quatro pontos para fazer as colheitas, tendo em consideração a dimensão do edifício, o número de pontos de água e a sua utilização. As torneiras amostradas localizavam-se em cantinas, refeitórios, balneários, casas-de-banho, e bebedouros, preferencialmente utilizadas pelas crianças para beber. A amostragem decorreu durante os meses de junho e julho de 2015. Nas escolas E e G, por serem maiores, foi repetida a amostragem em diferentes pontos de colheita.

No total, foram colhidas: (1) trinta e seis amostras de água para análise físico-química e microbiológica; (2) vinte e duas amostras de arejadores para análise microbiológica; (3) trinta e três amostras de superfícies das torneiras para análise microbiológica; e (4) vinte e nove amostras de superfícies para análise de ATP.

2. Procedimento de amostragem

2.1 Amostragem de água para análise microbiológica

O procedimento adotado nas colheitas de água para a análise de parâmetros microbiológicos foi realizado de acordo com a Recomendação ERSAR n.º 03/2010 - *Procedimento para a colheita de amostras de água para consumo humano em sistemas de abastecimento*.

Resumidamente, procedeu-se à desinfecção da torneira com álcool etílico, de seguida abriu-se a torneira para escoamento de água estagnada durante sensivelmente 5 minutos e foi colhida a amostra para frascos estéreis. Foram colhidas 36 amostras e em cada ponto de amostragem foi colhido 1L de água.

2.2 Amostragem de arejadores e superfícies de torneiras para análise microbiológica

A maior parte das torneiras possuíam arejadores/emulsores (Figura 3), vulgarmente designados de filtros, dispositivos que são utilizados para a redução de consumo de água e direcionar o fluxo. Nas torneiras com arejador amovível (Figura 4A), este foi retirado e colocado num frasco com 20 mL de água peptonada e agitado vigorosamente durante 2

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

minutos. Também nas torneiras sem arejador (Figura 4B) e com arejador amovível (Figura 4A) foi realizada amostragem ao bocal e às superfícies internas. Nas torneiras com arejador integrado (Figura 4C) a amostragem incidiu nas superfícies do bocal incluindo o arejador.

A amostragem das superfícies das torneiras foi realizada, após terem sido retirados os acessórios (ex. arejadores ou mangueiras), com recurso a zaragatoas estéreis, introduzidas no bocal das torneiras e rodadas do ponto mais afastado para o mais próximo da saída de água. As zaragatoas foram armazenadas em água peptonada e tal como todas as outras amostras mantidas a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ em malas térmicas com termoacumuladores e transportadas até ao laboratório num limite máximo de 4h após a colheita.



Figura 3. Arejadores de torneiras.



Figura 4. A) Torneira com arejador amovível. B) Torneira sem arejador. C) Torneira com arejador integrado.

2.3 Amostragem de arejadores e superfícies internas das torneiras para análise de ATP

Para a colheita das amostras nas torneiras sem arejador e com arejador amovível, as zaragatoas foram introduzidas no bocal das torneiras e rodadas do ponto mais afastado para o mais próximo da saída de água; enquanto que nas torneiras com arejador integrado, a zaragatoa foi utilizada no arejador, devido à impossibilidade de ser retirado.

3. Análise físico-química

No local de amostragem foi determinada a Temperatura da água, o pH, o Cloro Total, o Cloro Residual Livre.

3.1 Temperatura

A temperatura da água foi determinada no local de amostragem com termómetro de infravermelhos (I 620-2100, VWR), que permite uma leitura instantânea da temperatura de qualquer superfície. Foram realizadas duas medições, no sentido de confirmar a temperatura da água.

3.2 pH

Para a determinação do pH, foi utilizado o equipamento *HI 83099 - COD and Multiparameter Bench Photometer* (HI 83099, Hanna Instruments), um fotômetro que com base na absorvância de uma substância, ou seja, na capacidade de absorver radiação eletromagnética, calcula a sua concentração.

Este equipamento adapta o método *Phenol Red*, no qual o reagente *Phenol Red Indicator* quando adicionado à água provoca alterações de cor na amostra numa gama de tons de amarelo a vermelho. O equipamento procede à leitura do valor de pH da amostra.

3.3 Cloro

Foram determinados nos locais de amostragem o Cloro Total e o Cloro Residual Livre. O equipamento utilizado foi o Fotômetro Multi-parâmetro *HI 83099* (HI 83099 - Hanna Instruments), que aplica o método EPA DPD (N-dietil-p-fenileno-diamina) (330.5). A reação entre o cloro e o reagente DPD provoca um tom rosa na amostra, e o equipamento apresenta o valor do parâmetro a avaliar em mg/L.

4. Análise Microbiológica

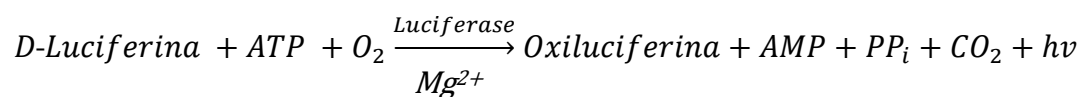
A análise microbiológica da água, das superfícies e dos arejadores incidiu sobre os parâmetros Bactérias Coliformes, *Escherichia coli*, Número de colónias a 22°C e 37°C, Esporos de *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus coagulase* positiva. A metodologia utilizada será apresentada na Tabela 2.

5. Análise Bioquímica

O grau de higiene das superfícies foi também avaliado recorrendo à análise de Bioluminescência com o equipamento HY-LiTE (HY-LiTE 2, Merck). Procedeu-se à medição de ATP em RLU's, no equipamento HY-LiTE de acordo com as instruções do fabricante.

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

Na presença de ATP, ocorre a seguinte reação entre o substrato luciferina e a enzima luciferase (Shama & Malik, 2013):



Da reação resulta a produção de luz (hv) que é medida em Unidades Relativas de Luz (URL's/RLU's), e é diretamente proporcional à quantidade de ATP detetada, indicando o nível de higiene das amostras analisadas (Amodio & Dino, 2014).

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

Tabela 2. Metodologia utilizada na análise microbiológica de água, superfícies internas das torneiras e arejadores.

Parâmetros microbiológicos	Água		Arejadores/superfícies internas das torneiras	Meio de cultura (País e fabricante)	Incubação (T°C e Horas)	Colônias típicas presuntivas	Testes de confirmação
	Volume	Método					
Bactérias Coliformes ¹	100 mL	Filtração por membrana	Espalhamento	Modified Tergitol 7 Agar Base (Índia, HIMEDIA Laboratories)	(36±2) ° C (21±3) h	Cor amarela	n.a.
<i>Escherichia coli</i> ¹	100 mL	Filtração por membrana	Espalhamento	Modified Tergitol 7 Agar Base (Índia, HIMEDIA Laboratories)	(36±2) ° C (21±3) h	Cor amarela	Oxidase (-) Indol (+)
Nº de colônias a 22°C ²	1 mL	Incorporação	Incorporação	Nutriente Agar (Itália, Biolife)	(22) ° C (24 ±48) h	n.a.	n.a.
Nº de colônias a 37°C ²	1 mL	Incorporação	Incorporação	Nutriente Agar (Itália, Biolife)	(37) ° C (24 ±48) h	n.a.	n.a.
Esporos de <i>Clostridium perfringens</i>	20 mL	Incorporação em anaerobiose	Incorporação em anaerobiose ³	Meat Liver Agar (Índia, Fluka) (e parafina líquida para garantir a anaerobiose)	(30) ° C (24± 48) h	Cor preta	n.a.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁴	250 mL	Filtração por membrana	Espalhamento	Pseudomonas Cetrimide Agar (Comunidade Europeia, VWR Chemicals - BDH Prolabo)	(37±1) ° C (48) h	Cor azul ou verde	n.a.
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i> ⁵	250 mL	Filtração por membrana	Espalhamento	Mannitol Salt Agar (Comunidade Europeia, VWR Chemicals - BDH Prolabo)	(37±1) ° C (48) h	Cor amarela	Gram (+) Catalase (+) Coagulase (+)

n.a.: Não aplicável;

¹ De acordo com a ISO 9308-1:2000 - *Water quality - Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*.

² De acordo com a EN ISO 6222 - *Enumeration of culturable micro-organisms - Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*.

³ Volumes utilizados: 10 mL nas superfícies internas das torneiras e 5 mL nos arejadores.

⁴ De acordo com a ISO 16266:2006 - *Water quality - Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa - Method by membrane filtration*.

⁵ De acordo com a NP 4343:1998 - *Water quality- Detection and enumeration of Staphylococci*.

Capítulo III – Resultados e Discussão

1. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química das amostras de água

Os resultados da análise microbiológica, e da análise físico-química estão apresentados, respetivamente, na Tabela 3 e na Tabela 4.

Tabela 3. Parâmetros microbiológicos obtidos nas análises de amostras de água (N= 36), e percentagem de amostras não conformes.

Parâmetros Microbiológicos	Valor Paramétrico (a)	Valor Mínimo	Valor Máximo	Não Conformidades	
				(%) (Nº de amostras)	Escolas
Bactérias Coliformes	0 UFC/100 mL	0	0	0	--
<i>E. coli</i>	0 UFC/100 mL	0	0	0	--
Nº de colónias a 22°C	100 UFC/mL ^(b)	$< 3,0 \times 10^1$	$2,8 \times 10^3$ ^(e)	30,6 (11)	B, C, E, G,
Nº de colónias a 37°C	20 UFC/mL ^(b)	0	$2,9 \times 10^3$ ^(f)	19,4 (7)	B, E, G,
Esporos de <i>Clostridium perfringens</i>	0 UFC/mL	0	0	0	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 UFC/250 mL ^(c)	0	0	0	--
<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	0 UFC/mL ^(d)	4	5	11,1 (4)	E, G

^(a) Com base no Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto; ^(b) O valor paramétrico definido é “sem alteração anormal” do histórico de análises, no entanto é recomendável que não exceda 100 UFC/mL (22°C) e 20 UFC/mL (37°C); ^(c) Valor paramétrico definido para águas colocadas à venda em garrafas ou outros recipientes; ^(d) Não existe regulamentação para água destinada a consumo humano; ^(e) Das 36 amostras, 11 apresentaram valores não recomendados, das quais 8 foram consideradas como Limite Superior do Método (LSM) (300 UFC); ^(f) Das 36 amostras, 7 apresentaram valores não recomendados, das quais 6 foram consideradas como LSM.

Do total de amostras analisadas, 30,6 % e 19,4% excederam as recomendações do **Nº de colónias a 22°C** e a **37°C** (Tabela 3). Foi considerado que as amostras que excederam os valores recomendáveis estariam em situação de não conformidade, uma vez que não foi possível comparar com o histórico de resultados analíticos, como indicado no Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto, e verificar assim a (a)normalidade dos valores. Desta forma, os valores recomendáveis não foram respeitados em 30,6% e 19,4% das amostras de **água**,

respetivamente. Para estes parâmetros os valores máximos obtidos foram expressamente superiores aos limites legais recomendados, $2,8 \times 10^3$ e $2,9 \times 10^3$, respetivamente. Estes valores são relativos às escolas B, C, E e G, sendo que na escola C foi apenas detetado crescimento microbiano a 22°C. Estes resultados indicam uma potencial contaminação e deterioração da qualidade da água (Mendes & Oliveira, 2004; Sartory, 2004). Deficiências ao nível de higienização e integridade do sistema de distribuição e abastecimento, um processo de tratamento e desinfeção da água ineficaz, e a presença de biofilmes, são igualmente potenciais causas para presença de microrganismos a 22 e 37°C (WHO, 2006; WHO, 2011).

Os **microrganismos heterotróficos a 22°C e 37°C** desenvolvem-se rapidamente perante um insuficiente teor de desinfetante, sendo que uma desinfeção eficaz, na generalidade, controla o crescimento, garantindo a qualidade da água (WHO, 2006). No entanto, nas escolas E e G, foram detetadas concentrações elevadas de cloro bem como de microrganismos heterotróficos a 22°C e 37°C nas amostras de **água**. Esta situação pode ser explicada pelo facto de os valores elevados de cloro não evitarem o crescimento microbiano quando existe disponibilidade de nutrientes e matéria orgânica (Lu *et al.*, 2013). Os biofilmes têm na sua constituição matéria orgânica nomeadamente células de microrganismos e suas substâncias poliméricas extracelulares, envolvendo as células, protegendo-as da ação de vários compostos químicos como antibióticos, biocidas e desinfetantes (Szewzyk *et al.*, 2000).

Foi detetada a presença de ***Staphylococcus coagulase positiva*** em 11,1% das amostras de **água**, nas escolas E e G. Atualmente, não existe enquadramento legal relativo a este parâmetro em águas para consumo humano, no entanto, as amostras que apresentaram crescimento e confirmação da presença deste grupo microbiano, foram consideradas amostras não conformes. Apesar deste grupo de *Staphylococcus* estar associado principalmente à ingestão de alimentos e não de água, o contacto e/ou ingestão de água com este microrganismo pode apresentar risco para a saúde. O contacto e multiplicação em alguns tecidos e/ou a produção de toxinas e de enzimas extracelulares são formas de patogenicidade destes microrganismos (Mendes & Oliveira, 2004; WHO, 2006; Barroso *et al.*, 2014). O simples facto de lavar as mãos ou beber água diretamente das torneiras (ato

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

não recomendável, mas frequentemente praticado por crianças), pode ter potenciais implicações para a saúde, principalmente se existirem lesões na pele ou mucosas que contactem com a água. Além disso, a ingestão das toxinas produzidas por *Staphylococcus coagulase positiva* são uma causas das intoxicações alimentares mais frequentes (Hennekinne *et al.*, 2012). Portanto, a presença deste microrganismo em águas para consumo humano (e.g. para preparação e confeção de alimentos nas escolas) pode comprometer também a segurança alimentar.

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos obtidos nas análises de amostras de água (N= 36), e identificação das escolas e da percentagem de amostras não conformes, considerando o valor paramétrico.

Parâmetros Físico-químicos	Valor Paramétrico ^(a)	Valor Mínimo	Valor Máximo	Não Conformidades	
				(%) (Nº de amostras)	Escolas
<i>pH</i>	6,5 pH - 9,0 pH	6,7	7,9	0	--
Cloro Residual Livre	0,2 mg/L - 0,6 mg/L ^(b)	0,03	1,03	8,3 (3)	B, E,
				(<0,2 mg/L)	
				47,2 (17)	A, C, D, E,
				(>0,6 mg/L)	F, G
Cloro Total	mg/L ^(c)	0,02	1,17	---	--
Temperatura	°C ^(c)	21	29,9	---	--

^(a) Com base no Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto; ^(b) Não é estabelecido um valor paramétrico, no entanto, tratando-se de um parâmetro indicador, é recomendado no Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto, um valor de cloro residual livre entre 0,2 e 0,6 mg/L; ^(c) Não existe regulamentação para água destinada a consumo humano.

A concentração de **cloro residual livre** nas amostras de **água** foi inferior ao mínimo recomendado (0,2 mg/L) em 8,3% das amostras, nas escolas B e E (Tabela 4). Nestas situações, não foi garantido um teor de cloro residual livre mínimo necessário para evitar o crescimento microbiano (WHO, 2011). Baixos valores de desinfetante residual podem ser um indício de presença de biofilmes, pela reação do cloro com microrganismos e matéria orgânica, que pode consequentemente levar a uma redução de desinfetante residual (Berger *et al.*, 2000). Não sendo garantida uma concentração residual de desinfetante, e perante a presença de microrganismos na água, pode ser facilitada a colonização de microrganismos nas superfícies das canalizações e/ou em biofilmes já existentes (WHO, 2011).

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

Em 47,2% das amostras de **água** a concentração de cloro residual livre foi superior ao valor máximo recomendado (0,6 mg /L), situação que pode ser alarmante, pela potencial presença de THM que são formados em medida proporcional à quantidade de cloro residual livre e de matéria orgânica disponível (Liang & Singer, 2003).

As altas concentrações de cloro, podem surgir devido a um aumento de dose de desinfetante, que segundo a WHO (2006), deve ser aumentado para mais de 0,5 mg/L apenas como resposta a potenciais surtos de doenças transmitidas pela água, ou em situações em que é detetada uma contaminação fecal num sistema de abastecimento (EPA, 2002). As concentrações de desinfetante residual livre superiores a 0,6 mg/L, não evitaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e microrganismos heterotróficos a 22°C e 37°C nas amostras de água nas escolas E e G. A presença destes microrganismos nas amostras de água, pode ter origem nas torneiras e seus arejadores, uma vez que são superfícies em contacto com a água, que oferecem características propícias ao crescimento de bactérias, como a acumulação de matéria orgânica que é utilizada como fonte nutritiva, e consequentemente potenciam o desenvolvimento de biofilmes (Zewzyk *et al.*, 2000).

2. Análise microbiológica das superfícies internas das torneiras e arejadores

As amostras das superfícies internas das torneiras e dos seus arejadores foram analisadas relativamente a parâmetros microbiológicos cujos resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores obtidos na análise microbiológica das superfícies internas das torneiras e arejadores, percentagem de amostras positivas e identificação das escolas.

Parâmetros Microbiológicos	Superfícies internas das torneiras (N=33)				Arejadores (N=22)			
	Valor Mínimo (UFC/unidade de amostragem)	Valor Máximo (UFC/unidade de amostragem)	Amostras Positivas (%) (Nº de amostras)	Escolas	Valor Mínimo (UFC/unidade de amostragem)	Valor Máximo (UFC/unidade de amostragem)	Amostras Positivas (%) (Nº de amostras)	Escolas
Bactérias Coliformes	0	0	0	--	$< 3,0 \times 10^1$	$< 3,0 \times 10^1$	18,2 (4)	D, F, G
<i>E. coli</i>	0	0	0	--	$< 3,0 \times 10^1$	$2,8 \times 10^2$	9,1 (2)	D, G
Nº de colónias a 22°C	$5,0 \times 10^1$	$6,2 \times 10^6$	66,7 (22)	A, B, C, E, F, G	$2,1 \times 10^2$	$2,9 \times 10^6$	86,4 (19)	A, B, C, E, F, G
Nº de colónias a 37°C	$4,5 \times 10^1$	$6,0 \times 10^6$	72,7 (24)	A, B, C, D, E, F, G	$1,6 \times 10^2$	7×10^5	100 (22)	A, B, C, D, E, F, G
Esporos de <i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0	--	--	Limite Superior do Método	9,1 (2)	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	--	--	$7,7 \times 10^2$	4,5 (1)	E
<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	$< 3,0 \times 10^1$	$2,6 \times 10^3$	9,1 (3)	E	$< 3,0 \times 10^1$	$< 3,0 \times 10^1$	18,2 (4)	E, G

Na análise microbiológica às **superfícies internas das torneiras** (N=33) e aos **arejadores** (N=22), apenas estes últimos apresentaram **Bactérias Coliformes** e *E. coli*. Nas escolas D, F e G foram detetadas Bactérias Coliformes em 18,2% das amostras, e nas escolas D e G *E. coli* em 9,1%. (Tabela 5). As Bactérias Coliformes são um bom indicador da qualidade da água pela sua sensibilidade à desinfecção. A presença destes microrganismos nos sistemas de distribuição e abastecimento de água pode indicar: (1) ineficácia da desinfecção ou perda de desinfetante ao longo da rede; (2) limpeza e integridade de rede comprometidas; (3) possível presença de biofilme; (4) e/ou intrusão de água contaminada no sistema de abastecimento (Clark *et al.*, 1996; Rompré, *et al.*, 2002; WHO, 2006). A presença de *E. coli* pode indicar que as escolas lesadas estejam perante uma contaminação fecal recente, infiltrações na rede de distribuição e/ou uma deficiente desinfecção (WHO, 2006).

Nas escolas D e G, foram detetadas nos **arejadores**, **Bactérias Coliformes** e *E. coli* em simultâneo, no entanto, os valores de cloro foram superiores a 0,6 mg/L (Tabela 5), situação que invalida as causas relacionadas com o desinfetante. A escola F apresentou Bactérias Coliformes, mas não foi detetada *E. coli*. Esta situação pode ser explicada pelo facto das Bactérias Coliformes poderem ser de origem ambiental, não fecal (WHO, 2006), ou tratar-se de uma não deteção de *E. coli* em estado viável mas não cultivável (Oliver, 2010).

Em todas as escolas foi detetada a presença de **microrganismos totais heterotróficos a 22°C e 37°C** nas **superfícies internas das torneiras** e **arejadores**, com a exceção da escola D onde não foram encontrados resultados positivos na pesquisa de microrganismos totais a 22°C em ambas as situações (Tabelas 5). O nível de contaminação destes equipamentos/materiais variou entre 5×10^1 e $6,2 \times 10^6$ UFC/unidade de amostragem e de $4,5 \times 10^1$ e 6×10^6 UFC/unidade de amostragem, para os microrganismos heterotróficos a 22°C e a 37°C, respetivamente. Este último parâmetro foi identificado em 100% das amostras de arejadores. Wingender & Flemming (2011) indicam que o número de microrganismos heterotróficos dos biofilmes varia normalmente entre 10^1 a 10^6 UFC/cm². Os valores obtidos neste estudo sugerem a potencial presença de biofilme, que pode ter influenciado a ação do cloro residual livre. A reação do cloro com o conteúdo dos

biofilmes (microrganismos e matéria orgânica), pode originar uma redução da concentração de desinfetante residual, e comprometer assim, a qualidade da água (Berger *et al.*, 2000).

Foram detetados **esporos de *Clostridium perfringens*** nos **arejadores** da escola C, em 9,1% das amostras (Tabela 5). Não foi possível quantificar os esporos, considerando-se assim Limite Superior do Método. A presença dos esporos desta bactéria pode ser indicador de uma contaminação de origem fecal prolongada e intermitente (Mendes & Oliveira, 2004). No momento da amostragem o teor de cloro residual livre foi superior ao recomendado, no entanto, os esporos são estruturas resistentes formadas por multicamadas que suportam variadas condições adversas como a radiação UV, calor, presença de desinfetantes, carência de nutrientes e produtos químicos (Pepper *et al.*, 2009). Os esporos sendo estruturas diferentes das células vegetativas, possuem maior resistência, razão que pode justificar uma provável contaminação antiga, ou em local mais distante (EPA, 2001b).

A bactéria ***Pseudomonas aeruginosa*** foi identificada nos **arejadores** da escola E, correspondente a 4,5% dos casos, com um valor máximo de $7,7 \times 10^2$ UFC/unidade de amostragem (Tabela 5). A contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* pode ter origem na água onde naturalmente pode estar presente, ou num consumidor que por contacto a tenha transferido, já que está presente no intestino e pele do ser humano (Brooks *et al.*, 2001). Na escola E, foram detetadas em simultâneo, colónias a 22°C e 37°C, microrganismos heterotróficos, que segundo Rusin, *et al.* (1997) incluem frequentemente *Pseudomonas aeruginosa*. A presença deste patogénico oportunista parece ser comum em biofilmes, tendo já sido verificada a capacidade de resistência e desenvolvimento deste patogénico oportunista em sistemas de abastecimento e distribuição de água para consumo (Wingender & Flemming, 2011; Vaz-Moreira *et al.*, 2012), e em sistemas de distribuição prediais (Moritz, *et al.*, 2010). Também outros microrganismos patogénicos oportunistas como a *Legionella* spp. e *Mycobacterium* spp., apesar de não terem sido pesquisados neste estudo, ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos, persistem e desenvolvem-se em biofilmes nos sistemas de abastecimento e distribuição de água, sendo considerados

microrganismos preocupantes, principalmente quando presentes espécies patogénicas na água (Wingender & Flemming, 2011).

Os *Staphylococcus* coagulase positiva foram detetados no interior das torneiras e nos arejadores em 9,1% e 18,2% das amostras, designadamente, na escola E e nas escolas E e G, respetivamente, com valores entre 1×10^1 e $2,6 \times 10^3$ UFC/unidade de amostragem (Tabela 5). O ser humano pode ser portador assintomático de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva), e pode representar uma fonte de contaminação de torneiras, bebedouros ou outras superfícies. Desta forma, a presença destes microrganismos nas torneiras e arejadores é preocupante devido à possibilidade de transmissão bidirecional do microrganismo entre os indivíduos e as superfícies contaminadas (Knox *et al.*, 2015). Os *Staphylococcus* coagulase positiva foram detetados em torneiras com arejador integrado de instalações sanitárias, local onde são utilizadas geralmente para higienização das mãos. As superfícies internas das torneiras e os arejadores, podem ter sido a fonte de contaminação da água, ou vice-versa, uma vez que nas escolas E e G foram detetados concomitantemente *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de água, torneiras e arejadores (Tabelas 3 e 5). Nos locais onde foram detetados *Staphylococcus* coagulase positiva, foi igualmente verificada a presença de microrganismos heterotróficos a 37°C. Nestes microrganismos podem-se incluir os *Staphylococcus* coagulase positiva que têm uma temperatura de crescimento entre os 18°C e os 40°C (Ferreira & Sousa, 2000). No presente estudo, a qualidade microbiológica da água poderá ter sido influenciada pela presença de biofilmes no sistema, com a possibilidade de conter vários microrganismos por sucessão microbiana, incluindo microrganismos potencialmente patogénicos, como *Staphylococcus* coagulase positiva.

Szewzyk *et al.* (2000) apontam para o facto de apenas uma pequena porção da população de biofilme ser pesquisada: a cultivável nos respetivos meios de cultura utilizados. A análise bioquímica de superfícies surgiu neste estudo como forma de complementar a análise microbiológica. Na década de 1980, a análise de ATP como meio de quantificação de células, foi largamente utilizada em vários estudos relacionados com a influência de materiais no crescimento microbiano (Szewzyk *et al.*, 2000).

3. Análise bioquímica das superfícies internas das torneiras

Neste estudo, foi avaliada a higienização das superfícies internas das torneiras (N=29) para análise da potencial presença de biofilmes, através da aplicação de métodos rápidos (conteúdo em ATP), e cujos resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores obtidos na análise de bioluminescência nas amostras das superfícies internas das torneiras, percentagem de amostras com valores superiores ao de referência, e identificação das escolas.

Superfícies internas das torneiras (N=29)					
Parâmetro	Valor de Referência	Valor Mínimo	Valor Máximo	Amostras com valores superiores ao de referência	
	(RLU's)	(RLU's)	(RLU's)	(%) (Nº de amostras)	Escolas
Bioquímico	100	4	260	17,2 (5)	A, C, D

RLU's – Unidades de Luminescência Relativa

Uma vez que a literatura diverge relativamente aos valores de referência, optou-se por considerar o critério mais exigente, designadamente 100 RLU's (Murphy *et. al*, 1998).

Os valores de bioluminescência variaram entre 4 e 260 RLU's, sendo que 17,2% das amostras excederam o valor de referência de 100 RLU's, nomeadamente nas escolas A, C e D. Estas escolas apresentaram também valores elevados de colónias a 22°C e 37°C nas superfícies internas das torneiras (Tabela 6), pelo que os resultados relativos ao deficiente estado de higienização são coerentes. No entanto, apesar das restantes escolas também terem apresentado valores elevados nos referidos parâmetros, na análise de bioluminescência isso não foi evidenciado, como é o caso das escolas E e G, que no geral expõem um panorama mais crítico de contaminação (Tabela 7) e apresentaram valores entre 5 e 60 RLU's e 8 e 27 RLU's, respetivamente (inferiores aos detetados nas escolas A, C e D).

De acordo com os resultados este método de análise pode não ser representativo da contaminação microbiológica existente, o que vai de encontro com o referido por outros

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

estudos que concluíram que o teste de bioluminescência não deve substituir a análise microbiológica tradicional, geralmente mais fiável (Larson *et al.*, 2003; Carrascosa *et al.*, 2012).

Esta discrepância pode também ter sido causada pela estratégia de amostragem, que contemplava primeiramente a realização da colheita para análise microbiológica de superfícies, e só depois a amostragem para análise de bioluminescência. Esta situação pode ter comprometido os resultados por eventualmente, na amostragem de superfícies para análise microbiológica, a quantidade de biofilme e microrganismos ficar diminuída.

4. Riscos associados pela presença de biofilmes nas torneiras e arejadores e a sua relação com a qualidade da água

Na Tabela 7 é apresentado um resumo do estado da qualidade microbiológica da água e do potencial aparecimento de biofilme nas superfícies internas das torneiras e arejadores pesquisados nas sete escolas, designadas de A a G.

Tabela 7. Resumo dos resultados não conformes/positivos obtidos para os parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de água, superfícies internas das torneiras e arejadores das diferentes escolas amostradas.

Parâmetros	Escolas						
	A	B	C	D	E	F	G
Qualidade de água							
Bactérias Coliformes							
<i>E. coli</i>							
Nº de colónias a 22°C		×	×		×		×
Nº de colónias a 37°C		×			×		×
Esporos de <i>Clostridium perfringens</i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva					×		×
Cloro Residual Livre (< 0,2 mg/L)		×			×		
Cloro Residual Livre (> 0,6 mg/L)	×		×	×	×	×	×
Superfícies Internas das torneiras							
Bactérias Coliformes							
<i>E. coli</i>							
Nº de colónias a 22°C	×	×	×		×	×	×
Nº de colónias a 37°C	×	×	×	×	×	×	×
Esporos de <i>Clostridium perfringens</i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva					×		
Arejadores							
Bactérias Coliformes				×		×	×
<i>E. coli</i>				×			×
Nº de colónias a 22°C	×	×	×		×	×	×
Nº de colónias a 37°C	×	×	×	×	×	×	×
Esporos de <i>Clostridium perfringens</i>			×				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					×		
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva					×		×

A cinzento escuro estão destacados microrganismos com potencial patogénico, e a cinzento claro indicadores de contaminação fecal.

Na generalidade, as amostras de **água** evidenciaram uma menor contaminação microbiológica, relativamente às superfícies internas das torneiras e arejadores. Estes resultados corroboram o fundamento de Flemming *et al.* (2002), que referem que a maior parte das bactérias encontra-se nas superfícies do sistema de distribuição, em biofilmes, e não na água. Hipoteticamente, esta diferença pode dever-se ao facto de o poder desinfetante do cloro ser superior nas bactérias presentes na água, do que nas inseridas em biofilmes, que oferecem mais resistência devido, entre outros fatores, à matriz de substâncias poliméricas extracelulares em que são envolvidos (Bridier *et al.*, 2011).

Os resultados deste estudo sugerem alguns indícios de contaminação da água pelos biofilmes associados às torneiras e arejadores. As **superfícies internas das torneiras** apresentaram os valores mais elevados nos parâmetros N° de colónias a 22°C e 37°C ($6,2 \times 10^6$ e 6×10^6 respetivamente), e ***Staphylococcus coagulase positiva*** ($2,6 \times 10^3$) que foram detetados em simultâneo nas amostragens das três tipologias (água, superfícies internas das torneiras e arejadores). Estes valores podem ter como causa, o formato da canalização, uma vez que em canos de menor diâmetro, como é o caso das torneiras, a formação de biofilmes parece ser potenciada (WHO, 2003c). Comparativamente aos arejadores, as superfícies internas das torneiras possibilitam uma maior área disponível para crescimento e desenvolvimento dos microrganismos heterotróficos, razão que pode justificar a maior concentração de colónias a 22°C e 37°C.

No entanto, os **arejadores** apresentaram uma maior diversidade de microrganismos que poderão ter mais implicações para a saúde pública. A estrutura e os materiais que constituem os **arejadores** podem ter promovido estes resultados, uma vez que são compostos geralmente por filtros de plástico e acessórios de borracha, materiais que segundo Lehtola *et al.* (2004) e Kilb *et al.* (2003) parecem favorecer o crescimento de microrganismos pelo potencial fornecimento de nutrientes. A retenção de matéria orgânica proveniente da água e do contacto com os utilizadores, bem como a estagnação/depósito de água nos arejadores, e a disponibilização de oxigénio pela interface água-ar podem contribuir igualmente para a colonização microbiana e consequentemente o desenvolvimento de biofilmes nestes acessórios (Walker *et al.*, 2014).

Os resultados deste estudo sugerem que os biofilmes presentes nas **superfícies internas das torneiras**, assim como nos **arejadores** podem constituir reservatórios de diversos microrganismos, incluindo os patogênicos oportunistas, podendo ser ou não detetados na água. Ao contrário dos *Staphylococcus* coagulase positiva que foram detetados simultaneamente nas amostras de água, nas superfícies internas das torneiras e nos arejadores, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* identificada nos arejadores, não foi detetada nas amostras de água. Estes resultados não garantem a ausência do risco de contaminação da água considerando a possibilidade de estar presente abaixo do limite de detecção, ou estar num estado viável mas não cultivável, e não ser assim detetada, mas representar igualmente uma fonte de contaminação (Oliver, 2010). A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* pode ser libertada do biofilme dos arejadores e consequentemente estar presente na água. Os microrganismos presentes nos biofilmes podem ser libertados com o aumento da colonização e pela exercerção de pressão, para a água (Walker *et al.*, 2014; Wingender & Flemming, 2011), situação que pode justificar a presença de *Staphylococcus* produtores de coagulase na água. A água contaminada pode servir como veículo de disseminação dos microrganismos, contaminando/infetando as superfícies, objetos, e indivíduos com que contacta.

A presença de microrganismos patogênicos oportunistas, como foi verificado nos **arejadores**, que são inclusive a parte mais exterior e exposta das torneiras, pode potenciar a sua transmissão às crianças que as utilizam, por contacto. As torneiras, os ralos, os lavatórios e os chuveiros, são locais onde já foi detetada *Pseudomonas aeruginosa*, que pela sua facilidade em colonizar biofilmes, resiste por longos períodos na água (Walker *et al.*, 2014). Vários estudos expõem a existência de surtos de *Pseudomonas aeruginosa* em ambiente hospitalar, e apontam como possível via de transmissão da bactéria o contacto direto com a água e a torneira ou por contaminação cruzada por equipamentos médicos ou pelas mãos dos profissionais de saúde (Ambroggi, *et al.*, 2016; Garvey *et al.*, 2016a, Garvey *et al.*, 2016b). Estes locais merecem especial atenção pela vulnerabilidade dos seus ocupantes, tais como crianças, idosos e imuno-deficitários, para os quais as doses infecciosas podem ser mais baixas. Através de água contaminada, quer por ingestão, quer pelo contacto ou pelo consumo de alimentos contaminados, podem sofrer infeções que comprometam a sua saúde (WHO, 2006).

- (1) Relativamente às instalações dos estabelecimentos escolares, a idade dos edifícios não parece ter condicionado a qualidade microbiológica da água e a formação de biofilmes, já que não existe um padrão nos resultados que possibilite uma relação entre a antiguidade do edifício e presença de biofilmes (Tabelas 1 e 7). Na generalidade as escolas E (11 a 20 anos) e G (≤ 5 anos) apresentaram um estado mais crítico relativo à presença de biofilmes e à qualidade microbiológica da água. Nas escolas A (21 a 40 anos), D (≥ 75 anos) e F (≥ 75 anos) a água cumpria com os valores paramétricos legais, e não apresentou microrganismos patogénicos oportunistas na análise às superfícies das torneiras e arejadores. O tipo e material da canalização, o caudal e o histórico das análises da água, são dados importantes que devem estar disponíveis. O material de composição das torneiras é pertinente, na medida em que, como referido anteriormente, pode potenciar a formação de biofilmes e a presença de patogénicos oportunistas, essencialmente pela disponibilização de nutrientes (Lehtola *et al.*, 2004; Kilb *et al.*, 2003). Associado à presença de biofilmes nas canalizações, está o risco de desprendimento de partes do mesmo, e de contaminação da água. O caudal da água, é importante por um lado, para o desenvolvimento de biofilmes na medida em que quanto maior for, disponibiliza uma maior quantidade de nutrientes e oxigénio, mas, por outro lado, favorece mais facilmente um desprendimento de porções de biofilme pela pressão realizada (Donlan, 2002; Stewart, 2012; Gomes *et al.*, 2014).

Considerando os resultados obtidos, os riscos associados à ingestão de água contaminada por microrganismos patogénicos oportunistas provenientes da eventual presença de biofilmes nas superfícies das torneiras e arejadores devem ser avaliados nas Escolas. Segundo o relatório do *National Research Council* (1998), uma avaliação de riscos ambientais para saúde deve contemplar: (1) a **identificação do perigo** (contaminantes microbiológicos que incluem os potenciais patogénicos que terão impacto na saúde pública, e que geralmente causam epidemias), (2) a **dose-resposta** para uma incidência na saúde (usualmente em relação a microrganismos patogénicos é considerado o grau de infecciosidade, uma vez que geralmente não existe uma concentração limiar para a ocorrência de infeção, no entanto, devem ser considerados os microrganismos com uma baixa dose infecciosa), (3) a **avaliação da exposição** (é realizada através de uma estimativa do volume de água ingerido e da concentração dos patogénicos na água), e por fim (4) a

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

caracterização do risco (deve ser realizada considerando a quantidade de patogénicos e a dose infecciosa, que é comparada com o “risco aceitável de infeção” de sensivelmente de 10^{-4} , que corresponde a um rácio de um caso de infeção em 10.000 pessoas, por ano), considerando a magnitude do problema (EPA, 2016b; WHO, s/d).

Os dados relativos à probabilidade de ocorrência de microrganismos patogénicos oportunistas na água e a sua infecciosidade são apresentados na Tabela 8 (Adaptada de WHO, 2006 - *Guidelines for Drinking-water Quality, Recommendations*).

Tabela 8. Microrganismos patogénicos oportunistas potencialmente transmitidos pela água, sua persistência nos sistemas de abastecimento e distribuição de água, e infecciosidade relativa considerando a via de infeção. Adaptado de WHO, 2006 - Guidelines for Drinking-water Quality, Recommendations.

Patogénico	Persistência nos sistemas de abastecimento e distribuição de água (a)	Resistência ao cloro (b)	Infecciosidade relativa (c)	Via de infeção
<i>E. coli</i> patogénica , incluindo a enteropatogénica (EPEC), enterotóxinogénica (ETEC) e enteroinvasiva (EIEC)	Moderada	Baixa	Baixa	Ingestão
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Moderada	Baixa	Alta	Ingestão
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Capacidade de Multiplicação	Moderada	Baixa	Contacto (d)
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	---	---	---	---

- (a) Corresponde ao período de deteção para fase infecciosa, em águas a 20°C, sendo considerado “Curto” até uma semana, “Moderado” entre uma semana e um mês, e “Longo” mais de um mês.
- (b) Quando o microrganismo em fase infecciosa está suspenso na água após tratamento e tempo de contacto convencional; um microrganismo com uma resistência “Moderada” pode não ser completamente destruído.
- (c) Baseado em experiências com humanos voluntários, ou em evidências epidemiológicas.
- (d) O contacto com a pele (especialmente lesionada), mucosas e olhos é a principal via de infeção, mas pode infetar via oral, utentes imunodeprimidos ou com cancro.

Considerando os resultados obtidos, podem ser reunidos alguns elementos relativos às diferentes fases da avaliação de riscos:

- (2) **identificação do perigo:** os agentes patogénicos detetados foram *Staphylococcus* coagulase positiva e *Pseudomonas aeruginosa*. A *E. coli* patogénica e enterohemorrágica foram, por precaução, igualmente consideradas (Tabela 8) porque apesar de não terem sido identificadas as estirpes, foi detetada a espécie *E. coli*. Relativamente aos *Staphylococcus* coagulase positiva, não existem dados relacionados com a sua persistência em sistemas de abastecimento e distribuição de água, resistência ao cloro e infecciosidade relativa, por este grupo não ser considerado preocupante em águas para consumo humano (WHO, 2006); no entanto, sabe-se que a via preferencial de infeção é, à semelhança da *Pseudomonas aeruginosa*, o contacto.
- (3) **dose-resposta:** A *Pseudomonas aeruginosa*, bem como a *Legionella* spp., e a *Mycobacterium* spp, parecem ter doses infecciosas altas para adultos saudáveis (10^6 - 10^8) e ser geralmente inofensivos, contudo, para grupos específicos como as crianças, as doses infecciosas são mais baixas e o risco associado pode ser acrescido (Wingender & Flemming, 2011).
- (4) **avaliação da exposição:** neste caso específico, o volume de água ingerido e a concentração dos patogénicos na água pode ser muito variável e de difícil previsão, atendendo à utilização que é atribuída à água das torneiras das escolas e que consequentemente representa vias de infeção diferenciadas. A água de uma torneira de uma cozinha será mais utilizada para consumo, logo a via de infeção será principalmente a ingestão, a de um chuveiro para banhos onde pode ocorrer a inalação de aerossóis contaminados, e a de uma torneira de instalações sanitárias será mais utilizada para lavar as mãos, cuja principal via de infeção será o contacto.
- (5) **caracterização do risco:** Apesar dos resultados deste estudo não serem suficientes para proceder à caracterização do risco, a severidade do perigo associado a microrganismos patogénicos oportunistas pode ser potenciado se estes forem resistentes a antibióticos. Neste estudo não foi testada a potencial resistência a antibióticos por *Staphylococcus* coagulase positiva e *Pseudomonas aeruginosa*, como já foi reportado nos estudos de Lin *et al.* (2016), Mbogori *et al.* (2013) e Vaz-Moreira *et al.* (2012). Sabe-se que a MRSA tem incidência em meio escolar, uma vez que foi detetada, em superfícies secas e muito tateadas pelos indivíduos, como os puxadores de portas das salas de aula e casas de banho (Lin *et al.*, 2016; Mbogori *et al.*, 2013). A *Pseudomonas aeruginosa* torna-se igualmente preocupante em escolas uma vez que o

contacto é a principal via de infeção, e as crianças/jovens são um grupo de risco. Com a agravante de que pode existir *Pseudomonas* resistente a antibióticos nos sistemas de distribuição e abastecimento de água, como o detetado no estudo de Vaz-Moreira *et al.* (2012). Mena & Gerba (2009), referem uma maior tendência para adquirir infeções cutâneas por indivíduos com menos de 18 anos, que pode estar relacionado com o facto de estes indivíduos visitarem com mais frequência águas recreativas, como banheiras de hidromassagem ou piscinas. Características relacionadas com a pele podem igualmente ter influência nesta incidência, uma vez que com o crescimento e envelhecimento, a pele vai sofrendo alterações, como a intensificação de secreções sebáceas que ocorre na puberdade, e que são importantes na lubrificação e impermeabilização da pele. Assim, indivíduos adultos, estão geralmente mais protegidos, exceto nos casos em que o sistema imunitário está enfraquecido, em que existe um contacto prolongado com a água, ou quando a *Pseudomonas aeruginosa* penetra na pele através de feridas ou queimaduras (Mena & Gerba, 2009).

Para salvaguardar a qualidade da água para consumo humano, potencialmente afetada pela presença de biofilmes, sugere-se a substituição ou a higienização periódica dos arejadores. Considerando que microrganismos patogénicos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus coagulase positiva* cuja origem poderá ser associada aos utilizadores, e considerando que a via de infeção pode ser por contacto, a higienização periódica das torneiras poderá evitar a colonização destes microrganismos em biofilmes. É igualmente recomendável, uma manutenção periódica ao sistema de canalização da água (especialmente se existirem reservatórios), assim como a implementação de boas práticas de sua utilização, e.g., evitar tocar no bucal das torneiras quer com as mãos, quer com a boca, e não beber água diretamente das torneiras.

Neste estudo, foram identificados em amostras de águas para consumo humano fornecidas por sistemas de abastecimento e distribuição, parâmetros que não são geralmente pesquisados, como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus coagulase positiva*. A potencial presença de biofilmes em torneiras, parece representar um risco para a saúde pública, considerando a possibilidade de contaminação da água, situação que parece ter ocorrido, em alguns casos.

Conclusão

Os resultados deste estudo indiciam a presença de biofilmes nas superfícies internas das torneiras e arejadores que parecem representar um fator de risco para a qualidade da água para consumo humano nas Escolas. A análise da qualidade da água revelou resultados não recomendados na contagem de microrganismos totais heterotróficos a 22°C e 37°C, *Staphylococcus aureus* (produtores de coagulase) e cloro residual livre, sugerindo a existência de deficiências na integridade dos sistemas de abastecimento e distribuição de algumas escolas. Relativamente à análise das superfícies internas das torneiras e arejadores, foi detetada a presença de microrganismos que estarão eventualmente associadas à presença de biofilmes, sendo eles: bactérias coliformes, *E. coli*, microrganismos totais heterotróficos a 22°C e 37°C, *Clostridium perfringens*, e inclusivamente organismos patogénicos oportunistas: *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus coagulase positiva*.

Os *Staphylococcus coagulase positiva*, potencialmente patogénicos para o Homem, foram detetados nas superfícies internas das torneiras, arejadores, e na água, em simultâneo. O facto de as crianças terem o hábito de beber diretamente da torneira, situação que pode originar uma transferência bidirecional de microrganismos entre o consumidor e as superfícies, pode representar riscos para a saúde da comunidade escolar, especialmente por se tratar de indivíduos mais vulneráveis.

Relativamente à caracterização das escolas não foi possível conhecer o material de constituição das canalizações, bem como se foram alvo de alguma intervenção ou manutenção. Esta informação seria importante, para verificar se o material das canalizações poderia estar associado a alguma influência na formação de biofilmes.

Um outro dado importante, ao qual não obtivemos acesso, foi o mapa da rede de distribuição do sistema de abastecimento, com a localização dos reservatórios de água. Estes dados seriam pertinentes para, juntamente com a localização das escolas, testar a possibilidade de relação entre os valores de cloro obtidos nas escolas e a distância destas aos pontos de recloração e reservatórios de água.

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

Outros parâmetros como a quantidade de matéria orgânica (carbono orgânico total), e a presença de subprodutos do cloro (como os THM e ácidos haloacéticos), poderiam ser inseridos na análise da qualidade da água, pelo potencial risco para a saúde pública. Neste estudo, 47,2% das amostras demonstraram concentrações de cloro superiores ao recomendado ($>0,6$ mg/L), com um valor máximo de 1,03 mg/L. Na presença de concentrações mais elevadas de cloro e de biofilmes, em princípio poderão existir mais THM e sem produzir efeito permanente na presença de biofilmes que podem voltar a surgir.

No sentido de impedir/remover os potenciais biofilmes que podem comprometer a qualidade da água para consumo humano, deve ser estabelecido um plano de higienização periódica das torneiras e arejadores e sempre que possível proceder à sua substituição, garantir uma manutenção periódica ao sistema de canalização da água, e implementar boas práticas de utilização da mesma.

Referências Bibliográficas

- Allen, M.J., Edberg, S.C., Reasoner, D.J. (2004). Heterotrophic plate count bacteria - what is their significance in drinking water?. *International Journal of Food Microbiology*. **92**: 265–274.
- Ambroggi, V., Cavalié, L., Manton, B., Ghiglia, M.-J., Cointault, O., Dubois, D., Prère, M.-F., Levitzki, N., Kamar, N., Malavaud, S. (2016). Transmission of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nephrology-transplant intensive care unit with potential link to the environment. *Journal of Hospital Infection*. **92**: 27–29.
- Amodio, E., e Dino, C. (2014). Use of ATP bioluminescence for assessing the cleanliness of hospital surfaces: A review of the published literature (1990–2012). *Journal of Infection and Public Health*. **7**: 92–98.
- ARSN. (2013). *Orientações para a vigilância sanitária de águas para consumo humano - Ano 2014*. Acedido em 13 de abril de 2015, em: http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Conte%C3%BAAdos/Sa%C3%BAde%20P%C3%BAblica%20Conteudos/Agua_Consumo_Programa2014_PV_SACH.pdf.
- Audenaert, W.T.M., Callewaert, M., Nopens, I., Cromphout, J., Vanhoucke, R., Dumoulin, A., Dejangs, P., Hullea, S.W.H.V. (2010). Full-scale modelling of an ozone reactor for drinking water treatment. *Chemical Engineering Journal* **157**: 551–557.
- Bagh, L.K., Albrechtsen, H.-J., Arvin, E., Ovesen, K. (2004). Distribution of bacteria in a domestic hot water system in a Danish apartment building. *Water Research*. **38**: 225–235.
- Bai, A.J., Rai, V.R. (2011). Bacterial *Quorum Sensing* and Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **10**: 184–194.
- Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., Taveira, N. (2014). *Microbiologia Médica*, Volume 1. LIDEL – Edições Técnicas, Lda. Lisboa.
- Berger, P.S., Clark, R.M., Reasoner, D.J. (2000). *Water, Drinking*. Second Edition, Encyclopedia of Microbiology. Vol. **4**: 898–913.
- Berry, D., Xi, C.W., Raskin, L. (2006). Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current Opinion in Biotechnology*. **17**: 297–302.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling, The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. **27**: 1017–1032.
- Boyle, M.A., O'Donnel M.J., Miller, A., Russel, R.J., Coleman, D.C. (2012). Control of bacterial contamination of washbasin taps and output water using Ecasol: a one-year study. *Journal of Hospital Infection*. **80**: 288–292.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. (2001). *Microbiologia Médica*. 22ª Edição. The McGraw-Hill Companies. Rio de Janeiro.
- Carrascosa, C., Saavedra, P., Millán, R., Jaber, J.R., Pérez, E., Grau, R., Raposo, A., Mauricio, C., Sanjuan, E. (2012). Monitoring of cleanliness and disinfection in dairies: Comparison of traditional microbiological and ATP bioluminescence methods. *Food Control* **28**: 368–373.
- Clark, R.M., Geldreich, E.E., Fox, K.R., Rice, E.W., Johnson, C.H., Goodrich, J.A., Barnick, J.A., Abdesaken, F. (1996). Tracking a *Salmonella* serovar typhimurium outbreak in Gideon, Missouri: role of contaminant propagation modelling. *Journal of water supply research & technology – Aqua*. **45**: 171–183.
- Cortes, M.E., Consuegra, J., Sinisterra, R.D. (2011). Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. **2**: 896–905.
- Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto. *Diário da República n.º 164 – I Série*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 130/2012 de 22 de junho. *Diário da República n.º 120 - I Série*. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. Lisboa.
- DGS. (2009). *Circular Normativa N.º 14/DA da DGS de 21/08/2009. Programa de Vigilância Sanitária de Piscinas*. Ministério da Saúde. Lisboa.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. **8**, No. 9, September 2002.

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

- EPA. (2001a). *Toxicological Review of Chloroform*. EPA/635/R-01/001. Washington DC.
- EPA. (2001b). *Parameters of water quality - Interpretation and Standards*. Environmental Protection Agency. Ireland.
- EPA. (2002). *Health risks from microbial growth and biofilms in drinking water distribution systems*. Office of Ground Water and Drinking Water. Washington DC.
- EPA. (2003). *LT1ESWTR Disinfection Profiling and Benchmarking Technical Guidance Manual*. EPA 816-R-03-004. Office of Water. Washington DC.
- EPA. (2016a). *Drinking Water Treatability Database - Conventional Treatment*. Environmental. Acedido em 20 de janeiro de 2016, em: <http://iaspub.epa.gov/tdb/pages/treatment/treatmentOverview.do?processId=1934681921>.
- EPA. (2016b). *The NRC Risk Assessment Paradigm*. Acedido em 02 de agosto de 2016, em: <https://www.epa.gov/fera/nrc-risk-assessment-paradigm>.
- ERSAR. (2010). *Recomendação ERSAR n.º 03/2010 - Procedimento para a colheita de amostras de água para consumo humano em sistemas de abastecimento*. Acedido em 13 de março de 2015, em: <http://www.ersar.pt/website/ViewContent.aspx?GenericContentId=0&SubFolderPath=&Section=MenuPrincipal&FolderPath=%5cRoot%5cContents%5cSitio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao>.
- Engelkirk, P.G., Duben-Engelkirk, J. (2012). *Burton – Microbiologia para as ciências da saúde*. 9ª edição, Guanabara Koogan LTDA. Rio de Janeiro.
- Fang, H.H.P., Xu, L.-C., Chan, K.-Y. (2002). Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*. **36**: 4709–4716.
- Ferreira, W.F.C., Sousa J.C.F., (2000). *Microbiologia*, Volume 2. LIDEL – Edições Técnicas, Lda. Lisboa.
- Flemming, H.-C., Percival, S.I., Walker, J.T. (2002). Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Science and Technology: Water Suppl.* **2**: 271–280.
- Flemming H.-C., Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. **8**: 623–633.
- Fret, J., Roef, L., Diels, L., Travernier, S., Vyverman, W., Michiels, M. (2016). Implementation of flocculation and sand filtration in medium recirculation in a closed microalgae production system. *Algal Research*. **13**: 116–125.
- Garg, A.X., Clark, W.F., Salvadori, M., Thiessen-Philbrook, H.R., Matsell, D. (2006). Absence of renal sequelae after childhood *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis. *Kidney International*. **70**: 807–812.
- Garvey, M.I., Bradley, C.W., Jumaa, P. (2016a). The risks of contamination from tap end filters. *Journal of Hospital Infection*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.006>.
- Garvey, M.I., Bradley, Tracey, B., Oppenheim, B. (2016b). Continued transmission of *Pseudomonas aeruginosa* from a wash hand basin tap in a critical care unit. *Journal of Hospital Infection*. **94**: 8–12.
- Gomes, I.B., Simões, M., Simões, L.C. (2014). An overview on the reactors to study drinking water biofilms. *Water research*. **62**: 63–87.
- Guerrero-Latorre, L., Gonzales-Gustavson, E., Hundesa, A., Sommer, R., e Rosina, G. (2016). UV disinfection and flocculation-chlorination sachets to reduce hepatitis E virus in drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **219**: 405–411.
- Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.* **36**: 815–836.
- INE. (2000). Proporção de águas superficiais (%) por Localização geográfica (NUTS-2002) e Classes de qualidade. Acedido em 25 de maio de 2016, em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0006687&contexto=bd&selTab=tab2.
- Inkinen, J., Kaunisto, T., Pursiainen, A., Miettinen, I.T., Kusnetsov, J., Riihinen, K., Keinänen-Toivola, M.M. (2014). Drinking water quality and formation of biofilms in an office building during its first year of operation, a full scale study. *Water research*. **49**: 83–91.
- IRAR. (2007). *Recomendação IRAR n.º 05/2007 - Desinfecção da água destinada ao consumo humano*. Acedido em 13 de março de 2015, em: <http://www.ersar.pt/website/ViewContent.aspx?SubFolderPath=%5cRoot%5cContents%5cSitio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao%5cOutrosdocumentosIRAR&Section=MenuPrincipal&FolderPath>

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

[ath=%5cRoot%5cContents%5cSitio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao&BookTypeID=5&BookCategoryID=2.](#)

ISO 9308-1. (2000). *Water quality - Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*. International Standard Organization. Switzerland.

Jiang, B., Liu, Y. (2012). Roles of ATP-dependent N-acylhomoserine lactones (AHLs) and extracellular polymeric substances (EPSs) in aerobic granulation. *Chemosphere*. **88**: 1058–1064.

Keevil, C.W. (2002). Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*. **4**: 249–258.

Keller, L., Surette, M.G. (2006). Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*. **4**: 249–258.

Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.-C., Wingender, J. (2003). Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **206**(6): 563–573.

Knox, J., Uhlemann, A.C., Lowy, F.D. (2015). Review: *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. *Trends in Microbiology*. **23**(7): 437–444.

Larson, E.L., Aiello, A.E., Gomez-Duarte, C., Lin, S.X., Lee, L., Della-Latta, P., Lindhardt, C. (2003). Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. *Food Microbiology*. **20**: 735–739.

Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Keinänen, M.M., Kekki, T.K., Laine, O., Hirvonen, A., Vartiainen T., Martikainen, P.J. (2004). Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Research*. **38**: 3769–3779.

Lehtola, M.J., Laxandera, M., I. T., Miettinen, I.T., Hirvonen, A., Vartiainen, T., Martikainen, P.J. (2006). The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. *Water Research*. **40**(11): 2151–2160.

Li, P., Li, M., Zhang, Y., Zhang, H., Sun, L., Li, B., (2016). The treatment of surface water with

enhanced membrane-aerated biofilm reactor (MABR). *Chemical Engineering Science*. **144**: 267–274.

Liang, L., Singer, P.C. (2003). Factors Influencing the Formation and Relative Distribution of Haloacetic Acids and Trihalomethanes in Drinking Water. *Environmental Science Technology*. **37**: 2920–2928.

Lin, J., Lin, D., Xu, P., Zhang, T., Ou, Q., Bai, C., Yao, Z. (2016). Non-hospital environment contamination with *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: proportion meta-analysis and features of antibiotic resistance and molecular genetics. *Environmental Research*. **150**: 528–540.

Lu, P.P., Chen, C., Wang, Q.F., Wang, Z., Zhang, X.J., Xie, S.G. (2013). Phylogenetic diversity of microbial communities in real drinking water distribution systems. *Biotechnology Bioprocess Engineering*. **18**(1): 119–124.

Ma, L., Jackson, K.D., Landry, R.M., Parsek, M.R., Wozniak, D.J. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Conditional Psl Variants Reveals Roles for the Psl Polysaccharide in Adhesion and Maintaining Biofilm Structure Postattachment. *Journal of bacteriology*. **188**(23): 8213–8221.

Mains, C., (2008). Biofilm Control in Distribution Systems. *The National Environmental Services Center at West Virginia University*. **8**(2): 1–4.

Matilainen, A., Vepsäläinen, M., Sillanpää, M. (2010). Natural organic matter removal by coagulation during drinking water treatment: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. **159**: 189–197.

Mbogori, C., Muigai, A., Kariuki, S. (2013). Detection and characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from toilet and classroom door handles in selected secondary schools in Nairobi County. *Open Journal of Medical Microbiology*. **3**: 248–252.

Mena, K.D., Gerba, C.P. (2009). Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Volume 201, D.M. Whitacre (ed.), Springer Science and Business Media.

Mendes, B., Oliveira, J. F. S. (2004). Qualidade da água para consumo humano. LIDEL - Edições Técnicas, Lda. Lisboa.

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

- Mi, Z., Dai, Y., Xie, S., Chen, C., Zhang, X. (2015). Impact of disinfection on drinking water biofilm bacterial community. *Journal of Environmental Sciences*. **37**: 200-205.
- Moghaddam, S.S., Moghaddam, M.R.A., Arami, M. (2010). Coagulation/flocculation process for dye removal using sludge from water treatment plant: Optimization through response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*. **175**: 651–657.
- Moritz, M.M., Flemming H.-C., Wingender, J. (2010). Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **213**: 190–197.
- Murphy, S.C., Kozlowski, S.M., Bandler, D.K., Boor, K.J. (1998). Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. *Journal of Dairy Science*. **81**(3): 817–820.
- Norton, C.D., LeChevallier, M.W. (2000). A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Applied Environmental Microbiology*. **66**: 268–276.
- Ojo, O.L., Otieno, F.A.O., Ochieng, G.M. (2012). Groundwater: Characteristics, qualities, pollutions and treatments: An overview. *International Journal of Water Resources and Environmental Engineering*. **4**(6): 162-170.
- Oliver, J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **34**: 415–425.
- O'Malley, F.L., Millward, H., Eggbeer, D., Williams, R., Cooper, R. (2016). The use of adenosine triphosphate bioluminescence for assessing the cleanliness of additive-manufacturing materials used in medical applications. *Additive Manufacturing*. **9**: 25–29.
- Paixão, M.A. (1999). *Águas e Esgotos em Urbanizações e Instalações Prediais*. 2ª Edição, Edições Orion. Amadora.
- Papageorgiou, A., Voutsas, D., Papadakis, N. (2014). Occurrence and fate of ozonation by-products at a full-scale drinking water treatment plant. *Science of the Total Environment* **481**: 392–400.
- Pepper, I.L., Gerba, C.P., Gentry, T., Maier, R.M. (2009). *Environmental Microbiology*. Second Edition, Academic Press (Elsevier).
- PORDATA. (2015). População servida por sistemas públicos de abastecimento de água, sistemas de drenagem de águas residuais e estações de tratamento de águas residuais (%) em Portugal. Acedido em 25 de maio de 2016, em: <http://www.pordata.pt/Subtema/Portugal/%c3%81gua+e+Saneamento-87>.
- Reading, N.C., Sperandio, V. (2005). Minireview – *Quorum sensing*: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **254**: 1–11.
- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V., Keevil, C.W. (1994). Influence of plumbing materials on biofilms formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 1842–1851.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.-R., Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. **49**: 31–54.
- Rusin, P.A., Rose, J.B., Haas, C.N., Gerba, C.P. (1997). Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev Environ Contam Toxicol*. **152**: 57-83.
- Sartory, D.P. (2004). Heterotrophic plate count monitoring of treated drinking water in the UK: a useful operational tool. *International Journal of Food Microbiology*. **92**: 297– 306.
- Saxena, T., Kaushik P., Mohan M. (2015). Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **82**(3): 249–264.
- Shama, G., Malik, D.J. (2013). The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **216**: 115– 125.
- Simões, L.C., Simões, M. (2013). Biofilms in drinking water: problems and solutions. *The Royal Society of Chemistry Advances*. **3**: 2520-2533.
- Stewart, P.S. (2012). Mini-review: Convection around biofilms. *Biofouling*. **28**:2, 187-198.

QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
BIOFILMES EM TORNEIRAS DE ESPAÇOS ESCOLARES.

- Sun, H., Shi, B., Bai, Y., Wang, D. (2014). Bacterial community of biofilms developed under different water supply conditions in a distribution system. *Science of the Total Environment*. **472**: 99–107.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer, K.-H. (2000). Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology*. **54**: 81–127.
- UNICEF, WHO. (2015). *Progress on Drinking Water and Sanitation – 2015 update and MDG assessment*. Acedido em 30 de agosto de 2016, em: <https://www.unicef.pt/progressos-saneamento-agua-potavel/files/progress-on-sanitation-drinking-water2015.pdf>.
- United Nations. (1949). *United Nations Universal Declaration of Human Rights 1948*. Acedido em 13 de abril de 2015, em: <http://www.un.org/en/documents/udhr/>.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., Manaia, C.M. (2012). Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. From drinking water. *Science of the Total Environment*. **426**: 366–374.
- Walker, J.T., Jhutti, A., Parks, S., Willis, C., Copley, V., Turton, J.F., Hoffman, P.N., Bennet, A.M. (2014). Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland. *Journal of Hospital Infection*. **86**: 16–23.
- Watanabe, A., Tamaki, N., Yokota K., Matsuyama, M., Koeguchi, S. (2016). Monitoring of bacterial contamination of dental unit water lines using adenosine triphosphate bioluminescence. *Journal of Hospital Infection*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.001>.
- Wingender, J., Flemming, H. C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **214**: 417–423.
- WHO. (2001). *Water Quality - Guidelines, Standards and Health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*. First published, IWA Publishing. London.
- WHO. (2002). *Heterotrophic Plate Count in Measurement in Drinking Water Safety Management*. Water, Sanitation and Health Department of Protection of the Human Environment. WHO/SDE/WSH/02.10. Geneva, Switzerland.
- WHO. (2003a). *The Right to Water*. Acedido em 13 de abril de 2015, em: http://www.who.int/water_sanitation_health/en/ri_ghettowater.pdf.
- WHO. (2003b). *Chlorine in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. WHO/SDE/WSH/03.04/45. Geneva, Switzerland.
- WHO. (2003c). *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety - The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health*. World Health Organization. London, United Kingdom.
- WHO. (2006). *Guidelines for Drinking-water Quality. First Addendum to Third Edition, vol. 1, Recommendations, 3rd ed.* World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- WHO. (2007). *pH in Drinking-water. Revised background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. WHO/SDE/WSH/07.01/1.
- WHO. (2008). *Guidelines for Drinking-water Quality. Third edition (Incorporating the first and second addenda) Volume 1- Recommendations*, WHO. Geneva, Switzerland.
- WHO. (2011). *Guidelines for Drinking-water Quality. Fourth Edition*, WHO. Geneva, Switzerland.
- WHO. (2014). *Preventing diarrhoea through better water, sanitation and hygiene: exposures and impacts in low- and middle-income countries*. WHO. Geneva, Switzerland.
- WHO. (s/d). *Chapter 4 - Methods used for health risk assessment*. WHO. Belgium.
- Zacheus, O.M., Lehtola, M.J., Korhonen, L.K., Martikainen, P.J. (2001). Soft deposits, the key site for microbial growth in drinking water distribution networks. *Water Research*. **35**(7): 1757–1765.
- Zhang, H., Tian, Y., Wan, J., Zhao, P. (2015). Study of biofilm influenced corrosion on cast iron pipes in reclaimed water. *Applied Surface Science*. **357**: 236–247.
- Zhao, T., Zhao, P., West, J.W., Bernard, J.K., Cross, H.G., Doyle, M.P. (2006). Inactivation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Rumen Content- or Feces-Contaminated Drinking Water for Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**(5): 3268–3273.

